

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**

**FACOLTA' DI AGRARIA**



**DOTTORATO DI RICERCA**

**IN AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA - XXIII CICLO**

**INDIRIZZO MIGLIORAMENTO GENETICO E ORTICOLTURA**

**Studio dei processi di resistenza a**  
***Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici***  
**in pomodoro**

**Tutore**

Dott.ssa Ercolano Maria Raffaella

**Coordinatore**

Prof. Lorito Matteo

**Candidata**

Dott.ssa Ferriello Francesca

# Indice

1. Introduzione.....	1
1.1 L'importanza economica del pomodoro .....	1
1.2 Avversità Pomodoro.....	2
1.3 Interazione pianta-patogeno .....	2
1.4 Identificazione dei geni coinvolti nel processo di resistenza.....	3
1.5 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> .....	5
1.6 Tecniche genomiche.....	5
1.6.1 I Microarray.....	6
1.6.2 Le librerie cDNA.....	9
1.6.3 La Real Time Pcr.....	10
2. Scopo .....	11
3. Materiali e metodi .....	12
3.1 Materiale vegetale e materiale fungino.....	12
3.2 Analisi molecolari .....	15
3.2.1 Estrazione RNA e produzione del cDNA .....	15
3.2.2 Analisi di espressione Real Time Pcr .....	16
3.2.3 Analisi trascrittomico Microarray .....	17
3.2.3.1 Microarray stripping .....	19
3.2.3.2 Analisi statistica .....	19
3.2.4 Costruzione della libreria Foward (SSH).....	20
3.3 Analisi bioinformatiche.....	22
3.3.1 Disegno dei primer .....	22
3.3.2 Analisi BLAST.....	22
3.3.3 Analisi di predizione della funzione biologica dei trascritti e dei cicli metabolici coinvolti.....	23

4. Risultati.....	24
4.1 Saggio di patogenicità e studio del decorso della malattia .....	24
4.2 Analisi trascrizionale del trascrittoma del pomodoro nell'interazione con il Forl .....	26
4.2.1 Esperimento microarray .....	26
4.2.1.1 Analisi della variazione di espressione nel tempo.....	34
4.2.1.1.1 Validazione dell'esperimento del confronto tra Momor inoculato e Momor non inoculato.....	34
4.2.1.1.2 Validazione dell'esperimento del confronto tra Monalbo inoculato e Monalbo non inoculato .....	35
4.2.1.1.3 Validazione dell'esperimento del confronto tra Momor inoculato e Monalbo inoculato .....	37
4.2.2 Analisi Cluster.....	39
4.2.3 Annotazione funzionale e ricostruzione dei cicli biosintetici .....	46
4.3 Libreria sottrattiva .....	55
4.3.1 Analisi funzionale e ricostruzione dei cicli biosintetici.....	56
5. Discussione.....	61
6. Conclusioni.....	71
7. Bibliografia.....	73

# **1. Introduzione**

## **1.1 L'importanza economica del pomodoro**

Il pomodoro è una solanacea originaria dell'America Sud occidentale che solo agli inizi del 1800 iniziò ad essere impiegata in Italia come condimento e alla fine dello stesso secolo iniziò ad essere trasformata industrialmente.

Attualmente il pomodoro è uno dei vegetali più coltivati nel mondo, e la sua produzione è in crescita, con primato dell'Asia. In Europa e in America settentrionale e in America meridionale le aree destinate alla coltivazione di pomodoro tendono a decrescere ma la produttività aumenta in quanto con l'aiuto del miglioramento genetico sono utilizzate piante ad alta produttività.

In Italia sono 38.000 le aziende agricole impegnate nella coltivazione del pomodoro (14.400 nella produzione del pomodoro da trasformazione e 23.500 nella produzione di quello da mensa). Degli oltre 550.000 ettari coltivati in Italia a ortaggi: 68.658 sono quelli che nel 2008 (l'8% in più rispetto all'anno precedente) sono stati coltivati per produrre pomodoro da avviare alla trasformazione, 3.000 quelli che invece sono stati coltivati per produrre pomodoro da mensa (per il consumo fresco).

In volume la produzione è pari a 4.900.000 di tonnellate di pomodoro per la trasformazione (43,7% nel Nord Italia, 7% nel Centro Italia e 49,3% nel Sud Italia). La produzione è concentrata per il 34% in Puglia e il 28% in Emilia Romagna.

Dal 2003 al 2007, l'Italia ha prodotto mediamente 6,5 milioni di tonnellate di pomodoro (pomodoro da industria più pomodoro fresco), pari al 38% dell'intera produzione dell'Unione europea. Di questi, 5,2 milioni di tonnellate sono destinati alla trasformazione (il 53% del volume trasformato dall'intera Unione europea) e 1,3 milioni di tonnellate di pomodoro per il consumo fresco.

In questo segmento di mercato l'Italia gioca un ruolo meno importante, rappresentando da sola il 19% dell'intera offerta europea. La superficie mediamente coltivata a pomodoro a livello nazionale si attesta negli ultimi anni attorno a 100.000 ettari, di cui poco più di 70.000 impegnati per la destinazione industriale e 31.000 ettari per il consumo allo stato fresco ([www.sgmarketing.it](http://www.sgmarketing.it)). Negli ultimi decenni particolare importanza viene data a questa coltura grazie alle proprietà organolettiche del frutto. Il frutto del pomodoro contiene abbondanti elementi nutritivi come: minerali (potassio, magnesio, calcio) e vitamine (A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C, E). La bacca di pomodoro possiede, inoltre, proprietà benefiche legate essenzialmente alla presenza di metaboliti quali carotenoidi, flavonoidi, e vitamine. In particolare il pomodoro contiene il licopene, un carotenoide, che a differenza del beta carotene non viene trasformato in vitamina A, ma svolge un'importante attività antiossidante.

## **1.2 Avversità Pomodoro**

Le avversità del pomodoro possono essere di origine abiotica (squilibri idrici, temperatura, grandine) che biotica (erbe infestanti, patogeni, virosi, e insetti). Le principali fitopatie di natura non parassitaria ma dovute a squilibri idrici provocano la perdita e il deprezzamento delle bacche. La presenza di piante infestanti può provocare danni di tipo sia diretto che indiretto, dovuti nel primo caso alla competizione per l'acqua e gli elementi nutritivi fra piante infestanti e la coltura del pomodoro, nel secondo caso alla possibilità che le piante infestanti ospitino agenti patogeni per le piante di pomodoro. Le piante infestanti rappresentano un problema per la coltivazione del pomodoro soprattutto nei primi stadi vegetativi, quando le piante, ancora molto piccole, rischiano di essere sopraffatte dalle malerbe.

Le avversità dovute a parassiti si distinguono in base all'agente biotico. Le crittogame (malattie fungine) più gravi sono quelle che provocano marciumi alle piantine in semenzaio oppure alle radici e al colletto delle piante adulte (*Fusarium*, *Verticillium*, *Rhizoctonia*). Il pomodoro è molto suscettibile alle virosi, i cui sintomi si manifestano con maculature dei lembi fogliari, malformazioni fogliari e stentata crescita della pianta. I parassiti animali provocano danni sia diretti, nutrendosi di tessuti vegetali (larve, coleotteri) o di linfa (afidi) che indiretti in quanto vettori di virus.

## **1.3 Interazione pianta-patogeno**

La pianta è sana allora quando si trova nelle condizioni di svolgere al meglio le sue funzioni fisiologiche oppure quando il suo fenotipo esprime per intero il genotipo. Secondo Owens la malattia, invece, è un disturbo o una deviazione dalla struttura normale o dalla normale fisiologia della pianta, localizzata o generalizzata, riconoscibile da qualche sintomo o segno e che produce un qualche danno alla pianta. Alla luce di ciò perché un evento patologico di natura parassitica avvenga, è necessario il concorso di almeno tre elementi: il patogeno che deve essere virulento, la pianta ospite che deve essere suscettibile e che le condizioni ambientali devono essere favorevoli. Se uno dei tre elementi non si verifica non si ha la malattia. Per racchiudere tale concetto Bateman parla del "triangolo della malattia", figura geometrica che ben interpreta il concetto di concomitanza di fattori nell'insorgenza del fenomeno patologico. Se aggiungiamo anche il fattore tempo inteso come persistenza delle condizioni ambientali all'attacco e quindi fattore che contribuisce a determinare la severità dell'attacco stesso possiamo parlare della "piramide della malattia".

Tutti i vegetali hanno la capacità di rispondere a un eventuale attacco patogeno ed evitare quindi l'insorgere di un eventuale malattia. La resistenza secondo l'American Phytopathological Society è la capacità della pianta ospite di annullare o ridurre l'attività di un patogeno oppure secondo Mussel è la capacità di inibire efficacemente o arrestare l'infezione e la colonizzazione di un patogeno.

Durante l'interazione pianta patogeno si avvia un processo di riconoscimento tra i due organismi. La pianta, infatti, può adottare vari meccanismi di difesa che possono essere riassunti in diversi modi di difesa.

Le tipologie di resistenza possono essere di natura meccanica (pre-infezione e post-infezione) e di natura biochimica (pre-infezione e post-infezione).

Nel primo caso le piante rispondono all'attacco di un eventuale patogeno con strutture statiche superficiali che formano una barriera alla penetrazione del patogeno. In questo caso giocano un ruolo fondamentale la cuticola, i tricomi, gli stomi, le lenticelle, e gli strati sclerenchimatici. Nella fase post-infezione invece si verifica successivamente al tentativo di penetrazione con la formazione di strutture che bloccano la progressione del patogeno. Queste strutture possono essere: strato ligno-suberizzato, strato di sughero, strato di abscissione, formazione di tille, depositi di gomma, rigonfiamenti cellulari, rottura di lisosomi, rilascio di fitoncidi, e reazioni necrotiche.

Nella resistenza biochimica pre-infezionale si ha la formazione di sostanze chimiche sintetizzate precedentemente al tentativo d'infezione come pro-inibitine, fitoanticipine o fitoncidi. Essi sono prodotti dal metabolismo secondario.

La resistenza biochimica post-infezionale è legata alla secrezione di sostanze che non erano presenti prima dell'infezione oppure che erano presenti in quantità ridotte: i fenoli, le fitoalessine, i R.O.S. (reactive oxygen species), le proteine PR (pathogenesis related), ecc. I fenoli esercitano la loro azione solo dopo ossidazione ad opera di fenolasi, fenolossidasi, perossidasi e polifenolossidasi in lignine, tannini e chinoni.

## **1.4 Identificazione dei geni coinvolti nel processo di resistenza**

Le piante hanno evoluto nel tempo diversi meccanismi di difesa contro l'attacco da parte dei patogeni. Nel 1960 Ross vide che il tabacco attaccato dal virus del mosaico (TMV) sviluppava nei tessuti distali una maggiore resistenza nella seconda infestazione da parte del virus (Ros, 1961). La resistenza diffusa negli altri tessuti fu chiamata resistenza sistemica acquisita (SAR). Questa resistenza può essere di lunga durata, per tutto il ciclo vitale della pianta e la protegge da patogeni come virus, batteri e funghi (Ryals et al., 1996; Sticher et al., 1997).

Molecolarmente la SAR è caratterizzata, sia nel tessuto localizzato che sistemico, dalla crescita di espressione di un gran numero di geni relativi alla patogenesi (PR genes). Le PR proteine sono state descritte nel 1970 da Van Loon che osservò l'accumulazione di molte nuove proteine dopo l'infezione del tabacco al TMV (Van Loon et al. 1970; Van Loon et al 1999).

Analizzando il processo di resistenza con maggior dettaglio si distingue una resistenza verticale e orizzontale.

La resistenza verticale ha una base monogenica che conferisce alle piante di resistere a una singola o poche razze del patogeno. L'ospite reagisce all'infezione da parte del patogeno con una risposta di ipersensibilità (HR) che è caratterizzata da una rapida morte cellulare del sito d'infezione (Hammond et al, 1996). Il gene di resistenza è solitamente coinvolto nel processo di riconoscimento ospite-patogeno.

La teoria nota "gene per gene" ha cercato di spiegare gli aspetti genetici dell'interazione ospite-patogeno (Flor, 1971; Keen, 1990; Staskawicz et al, 1995). Seconda questa teoria i geni per la resistenza (R) dell'ospite corrispondono geni per l'avirulenza (Avr) del patogeno, e ciò determina uno specifico riconoscimento.

I geni Avr conferiscono al patogeno un fenotipo virulento se interagiscono con una pianta dotata dei geni di resistenza R. Questi geni sono efficaci nei confronti di patogeni fungini, batterici e virali ed ogni caso anche contro insetti e nematodi (Martin, 1999). I geni R sono classificati in cinque categorie (Martin, 2003). Alla prima categoria appartengono geni simili alla serina/treonina proteina chinasica (Loh et. al., 1998; Martin et.al. 1993). La seconda classe comprende geni che mostrano un dominio LLR<sub>S</sub> (Leucine-Rich Repeats), un sito NBS (nucleotide binding site), e un dominio LZ (N-terminal putative leucine-zipper) o sequenza CC (Coiled-coil).

La terza classe ha caratteristiche simili alla precedente ma i geni presentano domini di tipo TIR (Toll and Interleukin 1 receptor) nella parte citoplasmatica. La quarta classe è formata da geni che mancano del dominio citoplasmatico come i geni Cf di resistenza a *Cladosporium fulvum*. L'ultima classe è formata da un gene Xa21 che oltre a un dominio extracellulare LRR e un TM (Transmembrane) presenta una regione citoplasmatica serina/treonina proteina chinasica (Song et. al. 1995).

La teoria "gene per gene" ha permesso di descrivere molti patosistemi riguardanti a patogeni intracellulari obbligati e intercellulari obbligati e facoltativi (Cervone et. al., 1997; Knogge 1996).

La resistenza orizzontale ha, invece, una base poligenica ed è attiva contro tutte le razze di un patogeno. Essa è più durevole rispetto alla resistenza verticale però il suo livello di efficienza dipende dalle condizioni contingenti quali l'andamento climatico e la quantità di inoculo del patogeno.

## **1.5 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici***

Negli ultimi anni in Italia si sono verificati attacchi di *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* a danno delle radici e del colletto. La malattia provocata da questo patogeno per la prima volta fu rilevata in Florida nel 1974. L'attacco del patogeno riguardò tutte le più grandi aree dove veniva coltivato il pomodoro, ma in particolare in suoli acidi e sabbiosi delle regioni produttive del Sud della Florida (Roberts et al., 2000).

Alcuni sintomi causati dal patogeno sono: ritardo della crescita, prematura caduta dei cotiledoni, lesioni scure sull'ipocotile, marcescenza delle radici fino alla morte della pianta. La diffusione del patogeno avviene attraverso due tipi di spore. Le microspore che possono essere trasportate dal vento, acqua e irrigazione e le clamidospore che sono gli organi di conservazione nel lungo periodo che possono contaminare il suolo attraverso scarpe sporche, attrezzi agricoli. Il movimento del fungo avviene solo in presenza di radici e la sua penetrazione avviene attraverso ferite accidentali o ferite naturali che si formano nel ricaccio di nuove radici. Le ife del patogeno inizialmente attaccano i peli radicali, successivamente tutta la superficie e le giunzioni delle radici sono colonizzate dal patogeno. Quando le piante attaccate dal Forl vengono tagliate longitudinalmente, estese decolorazioni marroni sono evidenti nella corteccia delle radici e del colletto. In confronto al relativo fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), il Forl produce decolorazioni meno estese dei vasi conduttori e inoltre, è favorito da temperature fredde (10°C a 20°C), pH acido, presenza di azoto ammoniacale e ristagni idrici (Roberts et al., 2000).

Attualmente il controllo di questo patogeno contro gli attacchi alle coltivazioni di pomodoro non sono facili da combattere in quanto il Forl colonizza rapidamente il suolo sterilizzato e persiste per lunghi periodi. Delle precauzioni, comunque, contro tale patogeno posso essere prese per limitare quanto più possibile il suo impatto sulle coltivazioni.

## **1.6 Tecniche genomiche**

La genomica è una branca della biologia molecolare che si occupa dello studio del genoma degli organismi viventi. In particolare si occupa della struttura, contenuto, funzione ed evoluzione del genoma. La genomica è una scienza abbastanza recente, infatti, nacque negli anni ottanta, quando furono prese le prime iniziative per il sequenziamento di interi genomi. Il primo sequenziamento del genoma di un organismo vero e proprio fu del batterio *Haemophilus influenzae* (completato nel



1995) mentre la *Arabidopsis thaliana* fu la prima pianta il cui genoma è stato completamente noto nella sua sequenza. Successivamente il numero di interi genomi sequenziati aumentarono esponenzialmente e questo ha portato alla nascita della genomica comparativa e della genomica funzionale. La genomica comparativa è una scienza che si occupa del confronto di genomi di organismi differenti mentre la genomica funzionale ha il ruolo di confrontare e di descrivere e trovare le funzioni di ogni singolo gene.

Alla genomica sono state affiancate anche altre scienze molto affine ad essa come: la trascrittomica, proteomica, metabolomica.

In particolare la trascrittomica, si occupa dell'espressione dei geni mediante l'ausilio degli RNA messaggeri di un intero organismo o di un particolare organo, tessuto o cellula in un particolare punto dello sviluppo dell'organismo o sotto particolari condizioni ambientali facendo principalmente uso di varie tecniche. Le principali metodologie utilizzate sono la Real Time Pcr, l'analisi di librerie cDNA e l'ibridazione "Microarray".

### **1.6.1 I Microarray**

I microarray hanno un ruolo fondamentale per lo studio dell'espressione genetica. Il primo esperimento microarray risale al 1995, anno in cui Schena e collaboratori hanno studiato l'espressione di foglia e radice in *Arabidopsis thaliana*, utilizzando una piattaforma composta da 45 ESTs (esprese sequence tag) (Schena et al, 1995). Questa tecnica consente di analizzare contemporaneamente l'attività di decine di migliaia di geni. I vetrini sono formati da moltissime molecole di acidi nucleici (dette sonde) depositate in una posizione nota su un supporto.

Da circa 25 anni, le tecniche standard di laboratorio per il rilevamento di specifiche sequenze nucleotidiche utilizzano una sonda (probe) di DNA, costituita da un piccolo frammento di acido nucleico marcato con un isotopo radioattivo o una sostanza fluorescente. La sonda, rappresentante la sequenza complementare a quella del gene da individuare, viene posta in contatto con un supporto solido (ad esempio, un gel od un filtro poroso) sulla cui superficie sono ancorati acidi nucleici provenienti da un dato genoma. Grazie alla peculiarità degli acidi nucleici di riconoscere le sequenze ad essi complementari, la sonda può legarsi in maniera selettiva al frammento ancorato ad essa complementare così che, semplicemente misurando la presenza e la quantità di marcatore legato al supporto solido, è possibile quantificare quanto è stato espresso un determinato gene (Southern, 1975).

Questa tecnica applicata per la prima volta da Ed Southern nel 1975, ha aperto di fatto la strada alla possibilità di analizzare i profili di espressione genica di un intero organismo. Tuttavia, l'applicazione su larga scala di questa metodologia si è avuta solo di recente grazie all'utilizzo di

supporti solidi non porosi, come il vetro, e alla messa a punto di tecniche fotolitografiche per la sintesi di frammenti oligonucleotidici ad alta densità spaziale. In particolare, i protocolli sviluppati dal gruppo di Pat Brown a Stanford, hanno permesso di ancorare automaticamente migliaia di catene di cDNA su vetrini da microscopio e grazie alla loro ibridazione con campioni di mRNA marcati selettivamente con molecole fluorescenti, di studiare il profilo di espressione di colture cellulari in stati fisiologici diversi (Brown et Botstein, 1999). Parallelamente, sono state messe a punto tecniche di mascheramento fotolitografico, normalmente utilizzate nell'industria dei semiconduttori, per la produzione di microarray con 400.000 sonde oligonucleotidiche su una superficie di un pollice quadrato (Lipshutz et al, 1999).

Esistono di fatto due tecnologie per la produzione di microarrays: la prima denominata a spotting e la seconda detta in situ.

Nella tecnologia spotting, le sonde da ancorare al supporto solido, normalmente un vetrino da microscopia, sono sintetizzate a parte e quindi depositate sul supporto. Tali sonde possono essere costituite da molecole di cDNA lunghe alcune migliaia di paia di basi le cui sequenze possono essere ricavate da banche dati genomiche (GenBank, dbEST o UniGene) o da librerie proprietarie costituite da cDNA non ancora completamente sequenziato. Nello studio dell'espressione di organismi eucarioti, le sequenze delle sonde sono normalmente ricavate dalle cosiddette Express Sequence Tags (EST), ovvero dalle porzioni codificanti identificate dai singoli progetti genoma. Tali banche dati contengono, assieme alle sequenze, anche tutta una serie di informazioni bibliografiche necessarie, oltre che per la scelta delle porzioni di DNA da depositare sulla matrice, anche per la successiva valutazione dei profili di espressione. Nel caso dei lieviti o di organismi procarioti le sonde sono generate per amplificazione diretta, con primers specifici, del DNA genomico. Selezionate le sequenze da studiare, il cDNA relativo viene prodotto mediante PCR ottenendo così sonde della dimensione da 600 a 2400 bps. Più recentemente, le sonde che vengono depositate sono rappresentate non tanto da frammenti di materiale genomico ottenuto via PCR, quanto piuttosto da sequenze sintetiche di oligonucleotidi lunghe 50-70 paia di basi.

Una volta prodotte, le sonde vengono depositate sul supporto solido, in genere costituito da un vetrino. La deposizione viene effettuata da sistemi robotizzati che mediante l'utilizzo di pennini prelevano le sonde direttamente dalle piastre utilizzate per la PCR e le depositano sul vetrino formando spots di circa 100-150  $\mu\text{m}$  di diametro, distanziati l'uno dall'altro 200-250  $\mu\text{m}$ . Durante la deposizione, il sistema di controllo del robot registra automaticamente tutte le informazioni necessarie alla caratterizzazione ed alla completa identificazione di ciascun punto della matrice (identità del cDNA, coordinate sul supporto, ecc.). Una volta sul vetrino, il probe viene legato covalentemente ai gruppi amminici del supporto attraverso una reazione innescata

dall'irraggiamento con luce ultravioletta, mentre il cDNA in eccesso viene rimosso con semplici lavaggi dell'array. Infine, il cDNA sul supporto viene reso a catena singola attraverso una denaturazione termica o chimica ([www.biogate.it](http://www.biogate.it)).

L'altra tecnica utilizzata per la produzione di microarrays è quella detta in situ in cui gli oligonucleotidi-sonda vengono sintetizzati direttamente sul vetrino tramite varie tecniche come quella fotolitografia (Affimetrix), quella MAS (Maskless Array Synthesizer, Nimblegen) e quella elettrochimica (Combimatrix).

I targets, ovvero gli acidi nucleici da ibridizzare alle catene di cDNA ancorate al supporto solido, sono normalmente ottenuti dalla marcatura dell'mRNA proveniente da un dato organismo per mezzo di molecole fluorescenti. Le molecole fluorescenti più comunemente utilizzate sono la cianina 3 (Cy3) e la cianina 5 (Cy5) che corrispondono alla fluorescenze rispettivamente verde e rosso con spettri di emissioni tra 570-670nm.

Probes e targets vengono poi messi a contatto per fare avvenire la reazione di ibridazione e dopo alcuni lavaggi per rimuovere i prodotti aspecifici, l'array viene passato attraverso uno scanner per la misura dei segnali fluorescenti. L'intensità dei pixel di ciascuna immagine è proporzionale al numero di molecole di tracciante presenti sullo spot e quindi al numero di probes che hanno ibridizzato le sonde ancorate al supporto.

Di fatto, livelli diversi di fluorescenza indicano livelli diversi di ibridizzazione e quindi di espressione genica. Il segnale rilevato dallo scanner viene poi sottoposto ad algoritmi di filtrazione e di pulizia del segnale e convertito in valori numerici .

In generale, quindi, un esperimento di analisi dei profili di espressione fornisce come risultato una matrice di dati, in cui le righe rappresentano i geni monitorati e le colonne corrispondono alle diverse condizioni sperimentali, quali punti temporali, condizioni fisiologiche, tessuti. Ogni elemento della matrice rappresenta quindi il livello di espressione di un particolare gene in uno specifico stato fisiologico. Ciascuna colonna è data da un vettore che ha tante dimensioni quanti sono i geni o le sequenze immobilizzate sull'array. Questo numero può raggiungere valori notevoli che vanno da circa 6000 per il genoma di un organismo semplice come il lievito di birra, fino a 5 volte tanto qualora si stiano analizzando i profili di espressione di organismi complessi.

La gestione e l'interpretazione dell'enorme quantità di dati generata dalle matrici ad alta densità rappresentano un aspetto fondamentale di questa tecnologia. Infatti, la loro applicazione nello studio dei profili dell'espressione genica produce volumi di informazioni tali da limitare l'applicazione delle tecniche modellistiche classiche. Tali tecniche non sono generalmente applicabili in maniera soddisfacente in presenza di sistemi poco caratterizzati e descritti da quantità grandissime di dati. È necessario, quindi, avere a disposizione tutta una serie di tecniche computerizzate capaci di gestire

ed interpretare questi enormi database nonché di interfacciarsi con gli strumenti bioinformatici per l'analisi funzionale ([www.biogate.it](http://www.biogate.it)).

### **1.6.2 Le librerie cDNA**

Le librerie cDNA sono costituite da una collezione di cloni che rappresentano un intero trascrittoma.

Le librerie cDNA consentono di comparare due popolazioni per identificare i geni differenzialmente espressi. In genere con questa metodologia sono confrontate due popolazioni di mRNA dai quali è sintetizzato il cDNA. Un campione è disegnato come “tester” e rappresenta il cDNA della popolazione che contiene i trascritti specifici (preferibilmente espressi) mentre l'altro campione rappresenta il “driver” cioè il cDNA della popolazione di riferimento.

Le librerie cDNA possono essere ottenute con diverse metodologie: “screening differenziale”, ibridazione sottrattiva e ibridazione soppressiva sottrattiva.

Nel primo caso il cDNA sintetizzato è inserito in vettori o plasmidi. I cloni ottenuti, dopo verifica dell'inserito, sono selezionati per ottenere la libreria cDNA finale.

La libreria per ibridazione sottrattiva è basata su una ibridazione delle due popolazioni di cDNA. Le sequenze che ibridano vengono rimosse mentre le sequenze che non ibridano rappresentano i geni che sono preferenzialmente espressi nel tester.

La libreria ottenuta per ibridazione soppressiva sottrattiva prevede la ligazione del tester con due adattatori. Successivamente vengono effettuate due ibridazioni sottrattive. Nella prima ibridazione il tester legato all'adattatore 1 e il tester legato all'adattatore 2 sono ibridati con il driver. In questa fase la maggior parte dei trascritti non differenziali del tester si legano al driver mentre la frazione di tester che rimane a singolo filamento risulta arricchita da sequenze differenzialmente espresse. Nella seconda ibridazione i prodotti della prima ibridazione (tester con adattatore 1 e il driver e tester con adattatore 2 e il driver) vengono uniti in un'unica soluzione con l'aggiunta di un'altra aliquota di driver. In questa ibridazione si ottengono sequenze differenzialmente espresse arricchite a doppio filamento asimmetriche ai due adattatori. Questo comporta un effetto soppressivo e la possibilità effettuare due reazioni Pcr con primer complementari ai due adattatori al fine di ottenere l'amplificazione selettiva dei trascritti differenzialmente espressi.

Con le librerie cDNA è possibile rilevare piccole differenze nel livello d'espressione dei trascritti, di isolare geni non caratterizzati in precedenza con altre tecniche e di ottenere pochi falsi positivi

Anche se questa metodologia comporta numerosi vantaggi, bisogna considerare che l'isolamento e il sequenziamento dei cloni è lenta e laboriosa, è richiesta una quantità elevata di materiale di partenza e si ottengono molti cloni con la stessa sequenza (ridondanza elevata)

### 1.6.3 La Real Time Pcr

La Real Time Pcr permette di monitorare in tempo reale l'andamento della reazione ed effettuare una quantizzazione del frammento amplificato. Questa tecnica si basa su un rilevamento e quantificazione di un segnale fluorescente (reporter). Il reporter è una molecola fluorescente che può essere o legante al DNA a doppio filamento o posto su una sonda. Nel primo caso si utilizza un colorante aspecifico che diviene fluorescente quando si lega al cDNA. Si utilizza come colorante aspecifico ad esempio il Syber Green che in soluzione mostra una fluorescenza bassa mentre quando si lega al cDNA il suo grado di fluorescenza aumenta di oltre 1000 volte. Poiché l'amplificazione PCR aumenta la quantità di cDNA presente, il segnale di fluorescenza aumenta in proporzione.

Nel secondo caso, invece di utilizzare un colorante aspecifico, il reporter può essere una sonda a sequenza specifica marcata all'estremità con un fluorocromo (sonda Taqman). L'utilizzo del fluorocromo viene utilizzato per la rilevazione del prodotto avendo in tal modo una maggiore specificità. La fluorescenza viene rilevata solo quando la sonda si ibridizza alla sequenza target di interesse.

La fluorescenza viene monitorata durante la reazione di amplificazione ed ad ogni ciclo. Il primo ciclo al quale lo strumento riesce a discriminare il valore di fluorescenza prodotta e rilevare il livello al di sopra del rumore di fondo è definito Ct o valore soglia.

I metodi di quantificazione tramite Real Time Pcr possono essere di tipo "assoluta" o "relativa". La quantificazione assoluta consiste nell'uso di una curva standard che è preparata facendo una diluzione seriale del template controllo a una concentrazione nota. I valori dei Ct dei campioni vengono confrontati con i valori dei Ct della curva standard in tal modo si avrà la quantificazione del numero di copie iniziali. Essa viene utilizzata, di solito, per conoscere il livello esatto di template.

La quantificazione relativa viene utilizzata nella maggior parte dei casi per studi che riguardano l'espressione genica. Nella quantificazione relativa, la quantità del trascritto di interesse viene rapportata a quella di un gene controllo. Generalmente il controllo è un gene che mostra un livello di espressione invariato nelle diverse condizioni analizzate. I geni di riferimento più utilizzati sono: actina, elongation factor, e geni ribosomiali.

## 2. Scopo

Il *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) è l'agente del marciume del colletto e delle radici in pomodoro. Negli ultimi anni questo patogeno è un fattore limitante nella produzione del pomodoro. Solo con l'adozione di buone norme agronomiche come la sterilizzazione del terreno di coltura (attraverso la solarizzazione e impiego di fumiganti), il mantenimento dei valori di pH del terreno tra 6-7 e l'accortezza di non provocare lesioni dell'apparato radicale durante il trapianto delle piantine è possibile limitare l'attacco del patogeno.

Lo studio dei geni implicati nella risposta di resistenza a questa malattia potrebbe facilitare la selezione di piante resistenti al patogeno.

Le analisi trascrittomiche hanno facilitato lo studio di molti patosistemi. In questo lavoro è stato studiato l'interazione patogeno-pomodoro attraverso diversi approcci trascrittomici: microarray, Real Time Pcr e librerie cDNA. Con la piattaforma Microarray è stato possibile ottenere una visuale globale del processo d'interazione Forl-pomodoro; con la tecnica della Real Time Pcr sono stati analizzati cambiamenti d'espressione durante un arco temporale di riferimento; con la costruzione di librerie di cDNA è stato possibile evidenziare trascritti rari responsabili del processo resistenza/suscettibilità al patogeno.

### 3. Materiali e metodi

#### 3.1 Materiale vegetale e materiale fungino

La prima parte del lavoro è stata incentrata sulla valutazione di due metodologie di inoculazione del fungo fitopatogeno. Sono stati saggiati diversi ceppi di *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (tab. 1).

Tab. 1. Ceppi di *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* utilizzati nel saggio di patogenicità

Genere	specie	forma specialis	ceppo	Provenienza
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	<i>radicis-lycopersici</i>	Forl Na	Portici-Micoteca
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	<i>radicis-lycopersici</i>	Forl Lt	Latina
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	<i>radicis-lycopersici</i>	Forl To	Torino
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	<i>radicis-lycopersici</i>	Forl To 1	Torino
<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>	<i>radicis-lycopersici</i>	ZUM2407	Leiden (Dr. Bloemberg)

Un primo saggio di inoculazione ha previsto l'inoculo nel terreno di un volume di sospensione conidica tale da raggiungere una concentrazione finale di  $10^3$  conidi/g di suolo. Semi di pomodoro cv. Marmande suscettibile a Forl sono stati, quindi, seminati nei suoli inoculati e coltivati per 21 giorni in serra.

Un secondo saggio di inoculazione ha previsto l'impiego di giovani piantine di pomodoro cv. Marmande allo stadio della prima foglia vera. Tali piantine sono state inoculate mediante immersione delle radici per 30 minuti in una sospensione conidica con una concentrazione di  $10^6$  conidi/ml. Le giovani piantine di pomodoro sono state trasferite in sabbia sterile e tenute in serra a condizioni controllate (21°C, fotoperiodo 16/8) per 21 giorni durante i quali sono state irrigate periodicamente con soluzione di Hoagland.

Al termine del periodo di coltivazione di entrambi i saggi sono state valutate l'incidenza e l'indice della malattia mediante analisi visiva dell'apparato radicale (Fig.1).

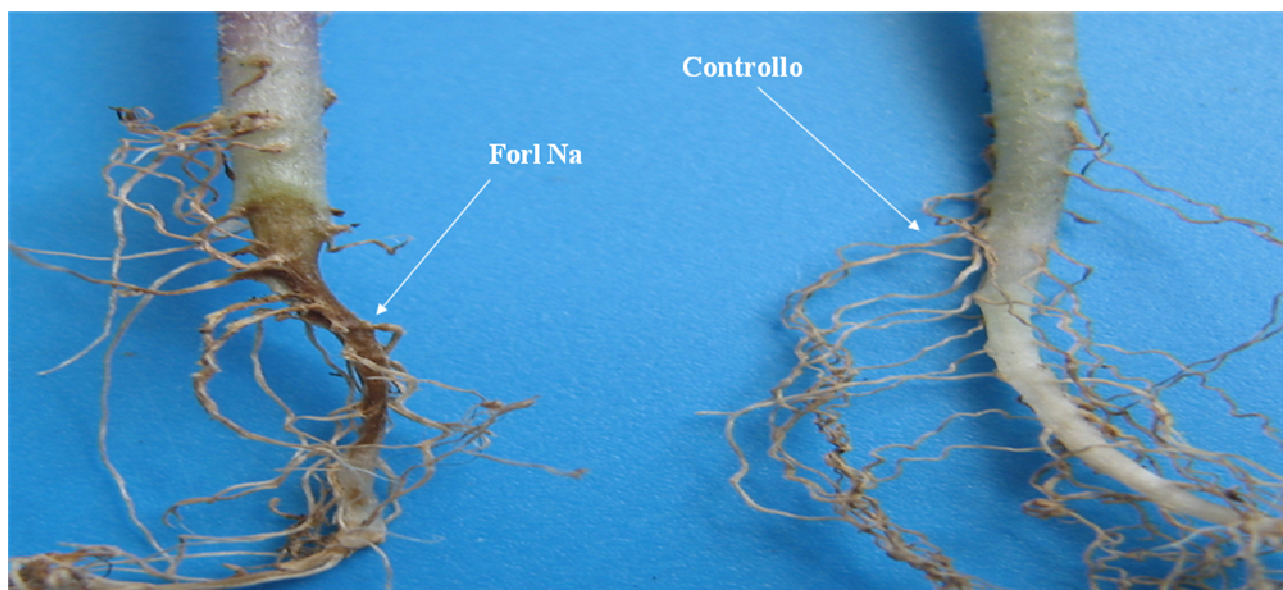


Fig.1 Cultivar Marmande inoculata da Forl-Na e il suo controllo

L'indice della malattia è stato valutato in accordo ai valori numerici riportata in tab.2.

Tab. 2. Scala dei valori dell'indice di malattia

<b>Scala di valori per la valutazione dell'indice di malattia</b>	
0	pianta sana
1	lesioni marrone su radici secondarie
2	marciumi estesi sull'apparato radicale e gravi danni al colletto
3	pianta morte

Il valore zero indica l'assenza di sintomi a carico dell'apparato radicale delle piantine di pomodoro mentre il valore massimo (3) indica la morte della piantina (Fig.2).





Fig. 2. Valutazione dell'indice di malattia di piantine di pomodoro inoculate con Forl

Successivamente sono state effettuate i saggi di patogenicità sulle linee isogeniche Momor (genotipo resistente) e Monalbo (genotipo suscettibile) attraverso il test di inoculo da piantina allo stadio di prima foglia vera utilizzando il ceppo Forl-Na. Sono stati pianificati diversi saggi di inoculazione per lo studio del decorso della malattia effettuando tre prelievi dei campioni inoculati nel seguente arco temporale: a tempo 0, a tempo 15 giorni e a tempo 21 giorni; inseguito per le successive analisi molecolari si è proceduto alla raccolta delle radici infette e non delle due linee nei seguenti tempi: tempo 0, tempo 7 giorni e tempo 21 giorni.

Al momento dell'espianto è stata valutata anche l'incidenza della malattia, espressa come percentuale di piante che presentano sintomi sul totale delle piante impiegate nei trattamenti.

Come desumibile dalla figura n. 3, il 94% delle piantine della linea isogenica Monalbo presentavano sintomi ascrivibili ad attacchi dell'isolato F55-Na mentre tale frequenza è ridotta nel caso delle piantine della linea isogenica Momor (Fig.3)



Fig. 3. Percentuale di piantine attaccate delle due linee isogeniche Momor e Monalbo

I dati ottenuti visivamente sono stati corroborati dall'isolamento del fungo delle piantine impiegate nella prova. L'analisi ha previsto un primo lavaggio sotto acqua corrente delle piantine di pomodoro in modo da allontanare eventuali contaminazioni esterne di Forl F55 Na. Una volta asciugate le piantine sono state sezionate per isolare il ceppo Forl F55-Na dai tessuti interni collocati al disopra del colletto. Sezioni di tali tessuti sono stati posti sul substrato agarificato Potato Dextrose Agar (PDA) acidificato una soluzione di Acido Lattico (25%).

Il Forl F55 Na è stato isolato in tutti i tessuti vegetali derivanti da piantine in cui l'indice della malattia era uguale o superiore al valore 1.

## 3.2 Analisi molecolari

### 3.2.1 Estrazione RNA e produzione del cDNA

Da 0,1 grammi di radici inoculate e non delle due linee isogeniche è stato estratto l'RNA totale. Il materiale è stato macinato in azoto liquido ed è stato estratto con l'RNeasy plant mini Kit (Qiagen). L'RNA è stato quantizzato allo spettrofotometro Nanodrop ed è stato visualizzato su gel di agarosio. L'integrità del RNA è stata testata con Agilent 2100 Bioanalyzer.

Il cDna è stato sintetizzato con l'utilizzo della Super Script III (Invitrogen) partendo da 1µg di RNA totale.

### 3.2.2 Analisi di espressione Real Time Pcr

Le reazioni Real Time Pcr sono state svolte presso la piattaforma genomica Genopom presso la quale sono stati dispensati la reazione e i campioni attraverso il sistema automatizzato (robot-Tecan Freedom Evo) e le amplificazioni sono state realizzate con 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Per ottenere la soluzione finale della reazione sono stati utilizzati 4,5µl di campione, 1,75µl di primer (forward e reverse) e 6,25µl di SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) per un volume totale di 12,5µl. Il profilo termico utilizzato è stato il seguente: 95°C per 10 minuti, 95°C per 15 secondi, 60°C per 1 minuto ripetuto per 40 cicli.

In seguito è stata prodotta una curva di dissociazione in modo da verificare che il plot di amplificazione ottenuto derivasse effettivamente dall'amplicone atteso. Il profilo termico della curva di dissociazione è stato il seguente: 95°C per 15 secondi, 60°C per 15 secondi e 95°C per 15 secondi (Fig. 4)

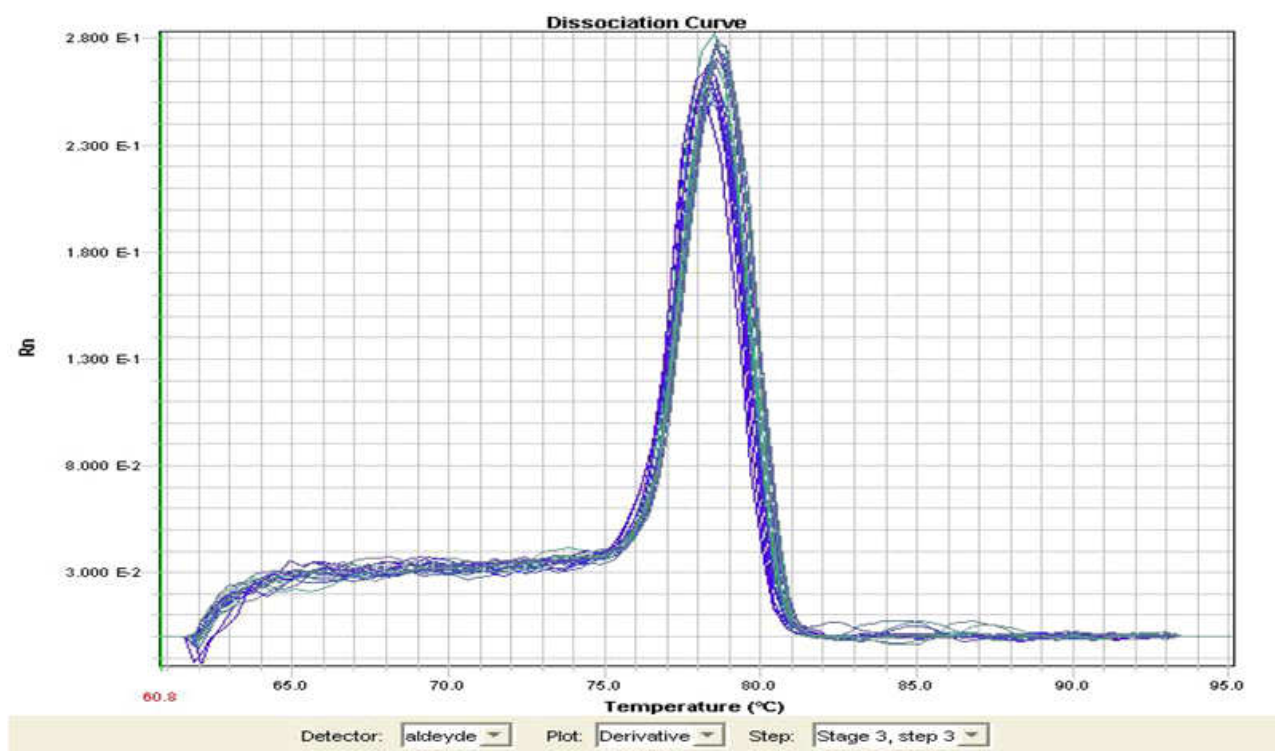


Fig. 4. Curva di dissociazione nell'esperimento Real Time Pcr

I primer sono stati validati attraverso la curva standard utilizzando un intervallo di diluizione di  $1-10^{-3}$  ( $R > 0,98$ ; pendenza vicino -3,32).

La quantificazione relativa è stata effettuata utilizzando il metodo comparativo del ciclo soglia ( $\Delta\Delta Ct$ ).

### 3.2.3 Analisi trascrittomico Microarray

L'analisi trascrittomico è stata effettuata su microarray TomatArray1.0 90K presso la piattaforma CombiMatrix della Functional Genomics Plant Center della Università degli Studi di Verona (<http://ddlab.sci.univr.it/Functional-Genomics/>). In tabella 3 sono riportate le informazioni relative alla progettazione del vetrino.

Tab. 3. Numero delle probe, delle repliche e dei controlli negativi presenti sul vetrino

<b>Informazione sul disegno del vetrino CombiMatrix</b>	
numero di probe uniche	23282
probe con più di un target	2507
repliche per probe	3
numero di target	28470
controlli negativi (batterici e virali)	40
numero di replicati per ciascun controllo	33

È stata utilizzata un aliquota di 2 µg di RNA totale per sintetizzare l'RNA antisenso (aRNA) con SuperScript™ Indirect RNA Amplification System Kit (Invitrogen) incorporating Alexa Fluor 647 Reactive Dye.

Successivamente alla marcatura del aRNA si è proceduti alla frammentazione come da tabella 4.

Tab. 4. Reazione di frammentazione dell'RNA

<b>Reazione di frammentazione dell'RNA</b>	
<b>Reagenti</b>	<b>Quantità</b>
Nuclease-free water	to 19.2 µl
5X RNA Fragmentation Solution	4.8 µl
Labeled RNA	microarray
Total Volume	24 µl

In seguito i campioni sono stati incubati a 90°C per 20 minuti per poi procedere alla pre-ibridazione utilizzando la soluzione riportata in tabella 5.

Tab. 5. Reazione della Pre-Ibridazione	
<b>Soluzione Pre-Ibridazione</b>	
<b>Reagenti</b>	<b>Quantità</b>
2X Hyb Solution Stock	60 µl
Nuclease-free water	41 µl
50X Denhardt's solution	12 µl
Salmon sperm DNA (10mg/ml)	1 µl
1% SDS	6 µl
Total Volume	120 µl

Dopo l'incubazione a 45°C per 30 minuti si è proceduto all'ibridazione con successiva incubazione a 45°C per 16 ore utilizzando la soluzione riportata in tabella n.6.

Tab. 6. Reazione dell' Ibridazione finale	
<b>Soluzione di Ibridazione</b>	
<b>Reagenti</b>	<b>Quantità</b>
2X Hyb Solution Stock	60 µl
DI Formamide (for RNA targets only)	30 µl
Labeled targets: DNA or fragmented RNA 2 to 8 µg per sample	Varies (up to 24 µl)
Salmon sperm DNA (10mg/ml)	1 µl
1% SDS	5 µl
Nuclease-free water	to 120 µl
Total Volume	120 µl

Dopo l'ibridazioni i lavaggi del chip sono stati effettuati come da protocollo CustomArray™ 90K Microarray Hybridization and Imaging (PTL020).

Dopo i lavaggi il vetrino microarray è stato coperto dalla "Imaging Solution" e dal vetrino LifterSlip™ (Fig. 5)

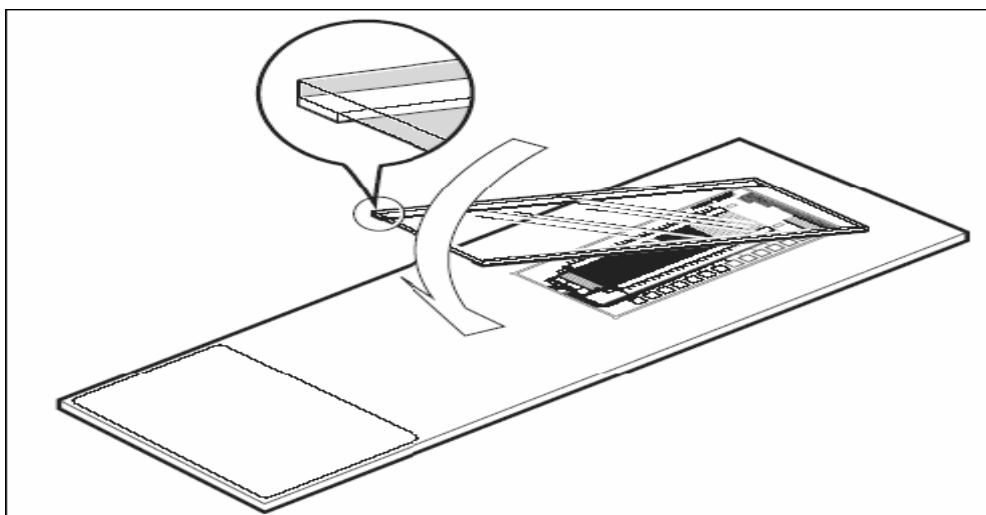


Fig. 5. CustomArray™ 90K with LifterSlip™ coverslip (Protocollo PTL020)

La digitalizzazione dei microarray è stata effettuata con un Perkin Elmer ScanArray 4000XL e con il software “ScanArray Express Microarray Analysis System v4.0” per l’acquisizione dell’immagine. Le immagini in TIFF ottenute sono state elaborate per estrarre i dati grezzi usando il CombiMatrix Microarray Imager Software v5.8.0.

### 3.2.3.1 Microarray stripping

Lo “stripping” dei vetrini CustomArray™ 90K è stato effettuato come da protocollo CombiMatrix CustomArray™ Stripping Kit (product number 610049). Gli array sono stati lavati e di nuovo ibridizzati per quattro volte.

### 3.2.3.2 Analisi statistica

Dopo la lettura di ogni vetrino con lo scanner si è proceduti nel posizionare la griglia (fornita dal produttore) sull’immagine visualizzata attraverso lo scannere per identificare la posizione degli spot sul vetrino; allegando il file contenete le specifiche di costruzione dell’array è stato possibile ottenere un “documento testo” con tutte le informazioni degli spot (per esempio: F635 Median, F635 Mean, B635 Median, B635 Mean) sulle quali sono state effettuate le analisi statistiche .

L’analisi statistica è stata svolta con il pacchetto LIMMA (Linear Model for Microarray Data) utilizzando il linguaggio R.

Il metodo scelto per l’eliminazione del background è stato effettuato attraverso i controlli negativi presenti nel vetrino.

Con il metodo “quantile” sono stati normalizzati i dati in quanto questa procedura è stata quella che più si è adattata alla nostra analisi.

I dati grezzi normalizzati sono stati sottoposti a un’analisi t-test e in seguito sono stati filtrati con  $p\text{-value} \leq 0,05$  al fine di ottenere la lista dei geni differenzialmente espressi.

### **3.2.4 Costruzione della libreria Foward (SSH)**

Per ottenere sequenze di cDNA differenzialmente espresse è stato utilizzato il metodo della ibridazione soppressiva sottrattiva (suppression subtractive hybridization, SSH), la cui attuazione è stata resa possibile attraverso la PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (BD Biosciences). La tecnica della SSH comprende due ibridazioni sottrattive, seguite da due reazioni di PCR. Nella figura 6 è rappresentato in modo schematico il processo della SSH : ci riferiamo con il termine tester al cDNA ottenuto dall’ mRNA isolato dal Momor inoculato a 15giorni con il termine driver al cDNA ottenuto dall’ mRNA di Monalbo inoculato a 15 giorni.

Il cDNA è stato sintetizzato a partire da 2µg di mRNA ottenuto con la purificazione dell’RNA totale dei campioni attraverso il Dynabeads® mRNA Purification Kit (Invitrogen) Sono stati effettuati dei passaggi di purificazione con fenolo-cloroformio-alcool isoamilico, e di precipitazione con etanolo dei cDNA sintetizzati. I cDNA tester e driver sono stati digeriti, poi, con l’enzima di restrizione Rsa I. Il cDNA del tester è stato suddiviso in due aliquote ed a ciascuna è stato legato un diverso adattatore: 1 e 2R. Dopo la verifica dell’efficienza della reazione di ligazione sono state eseguite due ibridazioni sottrattive. La prima è stata effettuata aggiungendo a ciascun tester legato ai due adattatori, driver denaturato in eccesso. Durante questa fase la maggior parte dei trascritti del tester non differenziali si lega al driver e la rimanente frazione del tester a singolo filamento risulta arricchita di sequenze differenzialmente espresse. La seconda ibridazione è stata effettuata unendo i prodotti della prima ibridazione e aggiungendo driver denaturato in eccesso. Durante questo passaggio, oltre ad arricchirsi di sequenze differenzialmente espresse, la frazione a singolo filamento del tester 1 ibriderà con la stessa frazione nel tester 2R, formando una popolazione di sequenze differenzialmente espresse a doppio filamento caratterizzate dal fatto di essere asimmetricamente fiancheggiate dai due adattatori. Utilizzando come primer sequenze complementari ai due adattatori è stato possibile effettuare l’amplificazione selettiva attraverso due PCR. La prima e la seconda PCR sono state svolte come da protocollo PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (BD Biosciences) tranne per l’aggiunta di olio minerale.

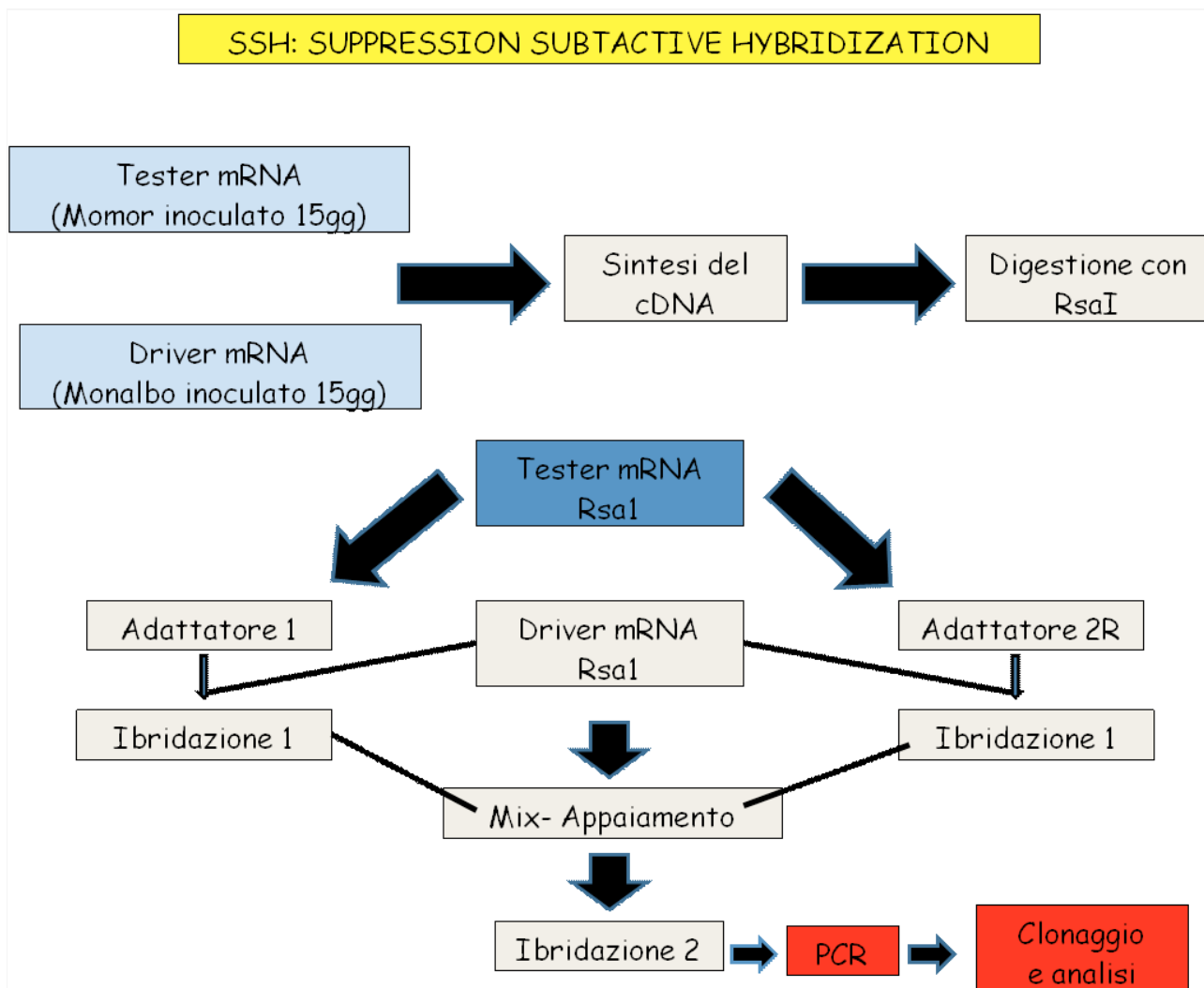


Fig. 6. Schema del protocollo *PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit* (BD Biosciences)

Gli amplificati ottenuti dalla seconda amplificazione sono stati inseriti nel vettore di clonaggio pGEM-T-Easy Vector systems (Promega).

Le colonie trasformate sono state cresciute e selezionate su LB (10 g/l di triptone, 5 g/l estratto di lievito, 10 g/l di NaCl) con 50µg/ml di ampicillina. Per la determinazione delle cellule trasformate è stata utilizzata la valutazione bianca/blu tramite x-Gal. Le colonie bianche sono state cresciute in mezzo liquido e il DNA plasmidico è stato estratto tramite il Kit High Pure Plasmid Isolation (Roche). I plasmidi sono stati sequenziati tramite reazione BigDye (AppliedBiosystem).



### 3.3 Analisi bioinformatiche

#### 3.3.1 Disegno dei primer

I primer sono stati costruiti con il programma PrimerExpress 3 Software (Applied Biosystem) sulle sequenze dei trascritti differenzialmente espressi scelti tra la lista dei trascritti differenzialmente espressi ottenuti con i Microarray. Le caratteristiche delle coppie dei primer hanno soddisfatto specifici parametri tra cui la lunghezza del frammento amplificato che ha variato tra i 60-150 bp, una temperatura di attacco di 60°C, una lunghezza di 20 nucleotidi. Le sequenze delle coppie dei primer disegnati sono riportate in tabella 7.

Tab. 7. Sequenze delle coppie dei primer dei 10 geni scelti per la validazione degli esperimenti Microarray

Nome	Sequenza primer Forward	Sequenza primer Reverse
Clone LEF2027J09 (TC197225_832_35_S)	CATGTGTGGATGCTCAAGTGG	ACCCCAAACCTACTGGACAAAG
Aldeide Deidrogenasi (TC201568_1592_37_S)	AAGAAGGCAGTCTACGTCGCA	AATCAAAGCACGAATGAGCCC
Hma1 gene (cadmium) (TC192023_936_40_S)	CTGAATTGTCTTGTGTCTGCA	TGAGCCAACTTCCAGGTCCTC
Alfa-N-acetilglucosaminidasi (TC212955_1034_37_S)	GAATGTGTTGTTGGCTGTGACA	GCAACCTCCTGCTGTGAACTA
Malato Deidrogenasi (TC195781_1143_40_S)	TATTTCCCCCTGGTCCCCCTAA	GCTCATTTCTTGACAAACCCGA
Clone: LEFL3144E07 (TC199937_683_36_S)	AACGTAGATGCATTGGACTCGG	CGTCCATCAAGACAGATCCACA
Glicosiltransferase (TC201994_449_40_S)	GTTTCATAACCAACCCTGGACAG	GCTCCAGCAGAGTCATCAACAA
Permeasi (TC194881_2539_40_S)	AATGCGCCGCTCCAAGATAT	TACAACGCGTATTTCACTCCCC
Glutatione transferasi (TC201057_531_38_S)	CTTTGAAGGCCCTTCCATCTT	CCAAAAACGAGCTGTAGCACG
Retrotransposon-like (TC202085_463_35_X3)	CGTCGGTGCCTATGCTATTAT	CAACATATGCGAGCCGACAAG

#### 3.3.2 Analisi BLAST

Il Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) è stato utilizzato per analizzare e confrontare una sequenza nucleotidica contro un database di sequenze nucleotidiche. Questo ha permesso di effettuare un'annotazione preliminare dei trascritti differenzialmente espressi ottenuti dalla tecnica microarray e SSH. I database utilizzati sono stati quelli dell'NCBI (National Center for Biotechnology Information), TIGR (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>).

### 3.3.3 Analisi di predizione della funzione biologica dei trascritti e dei cicli metabolici coinvolti.

Sono stati utilizzati i seguenti programmi per effettuare un'analisi funzionale: Mapman, David e GeneTrail.

L'analisi con il programma Mapman (<http://mapman.gabipd.org/web/guest>) ha permesso di rilevare i trascritti in un'interfaccia grafica che mostra le funzioni cellulari. Per l'utilizzo del programma i TC dei trascritti differenzialmente espressi sono stati convertiti attraverso il sito "<http://ted.bti.cornell.edu/>" in ID TOM2 oligo array gal file.

Per l'utilizzo del database online DAVID (Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) e del database on line GeneTrail (<http://genetrail.bioinf.uni-sb.de/>) sono state convertite i TC dei trascritti differenzialmente espressi con omologhi in *Arabidopsis thaliana* attraverso il sito Tair ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)). Con questi due programmi sono stati confrontati le liste dei differenzialmente espressi con i tool disponibili, sia grafici che testuali, che permettono di raggruppare le proteine o i geni secondo, ad esempio, categorie funzionali. Per il programma David sono stati considerati significativi la categorie con un Similarity Threshold pari a 0,50, fattore di correzione Benjamini mentre per il programma GeneTrail sono stati considerati significativi le categorie con un p-value < 0,05 aggiustati con il metodo Bonferroni e FDR.

Con questi due programmi è stato possibile, anche, mettere in evidenza i cicli metabolici in cui i geni identificati sono coinvolti mediante l'analisi Kegg ([www.genome.jp/kegg](http://www.genome.jp/kegg)).

## 4. Risultati

### 4.1 Saggio di patogenicità e studio del decorso della malattia

Il primo passo per studiare il patosistema pomodoro-Forl è stato l'ottenimento di materiale vegetale sicuramente infetto. A tal proposito sono stati saggiati diversi ceppi di *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Nelle prime prove di patogenicità è stata utilizzata la cultivar Marmande suscettibile al Forl.

Dall'analisi visiva dei sintomi causati alle radici dei diversi ceppi, il ceppo Forl-Na ha mostrato il valore d'indice di malattia più elevato e quindi è stato selezionato per eseguire gli ulteriori esperimenti.

Il patogeno è stato sia inoculato direttamente nel substrato di semina che nelle radici delle piantine al primo stadio di foglia vera.

Il protocollo d'inoculo su piantine allo stadio di prime foglie vere ha mostrato un risultato più uniforme e ripetibile e pertanto è stato scelto per le successive prove sulle linee isogeniche Momor e Monalbo (Fig. 7).



Fig. 7. Genotipo Momor e genotipo Monalbo inoculato da Forl-Na e rispettivi controlli.

Durante la prova è stato osservato il decorso della malattia per determinare i momenti ottimali per il prelievo di campioni. A 7 giorni dall'inoculazione nei genotipi suscettibili è stata osservata una decolorazione brunastra che si estende dall'interno delle cellule del parenchima alla regione del cilindro centrale mentre dopo il decimo giorno di inoculazione l'infezione interessa anche tutta

l'area del colletto, presentando un colore marrone scuro. L'avvenuta reazione dell'interazione con il fungo è stata accertata non solo mediante crescita in vitro del fungo da sezioni di tessuto ma anche mediante l'analisi molecolare attraverso l'uso della Real Time Pcr.

Dopo ogni esperimento d'inoculazione per saggiare l'avvenuta interazione pianta-patogeno è stata effettuata un'analisi d'espressione Pcr Real Time, confrontando campioni di radici infette da Forl a 21 giorni dall'inoculazione della cultivar Marmande con il controllo non inoculato. L'analisi è stata effettuata utilizzando quattro geni noti per essere coinvolti nel processo resistenza pianta-patogeno. I geni scelti come candidati dell'analisi sono stati: Pal, Catalasi, RLK4 Serina/treonina, e Beta-glucosidase (Fig. 8).

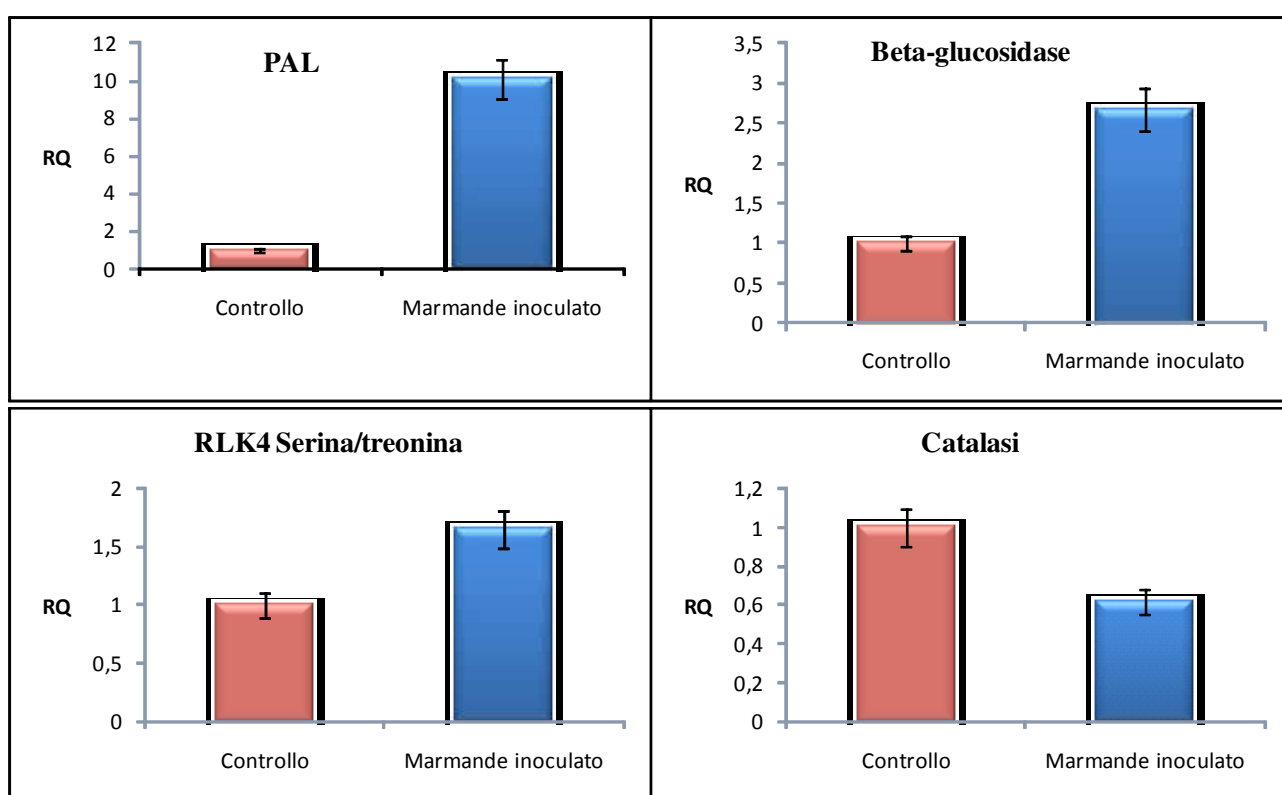


Fig. 8. Analisi di espressione mediante Real Time Pcr dei geni Pal, Beta glucosidase, RLK4 serina/treonina e Catalasi

I geni PAL, Beta-glucosidase e RLK4 serina/treonina hanno mostrato una chiara sovraespressione nel campione inoculato rispetto al controllo non inoculato mentre nel campione inoculato il gene Catalasi è stato sottoespresso. Questi risultati hanno confermato una risposta differenziale tra i campioni inoculati e non.

Successivamente si è proceduto a effettuare una prova di inoculazione sulle linee isogeniche Momor e Monalbo. Durante il saggio sono stati raccolti campioni di radici in tre differenti tempi

dall'inoculazione: a momento dell'inoculazione (0 DPI), a 15 giorni dopo l'inoculazione (15 DPI) e a 21 giorni dall'inoculazione (21 DPI).

I geni che codificano per la Catalasi per la Beta-glucosidase sono stati scelti per osservare variazione di espressione in entrambi genotipi inoculati a 0 DPI, 15 DPI, 21 DPI (Fig. 9).

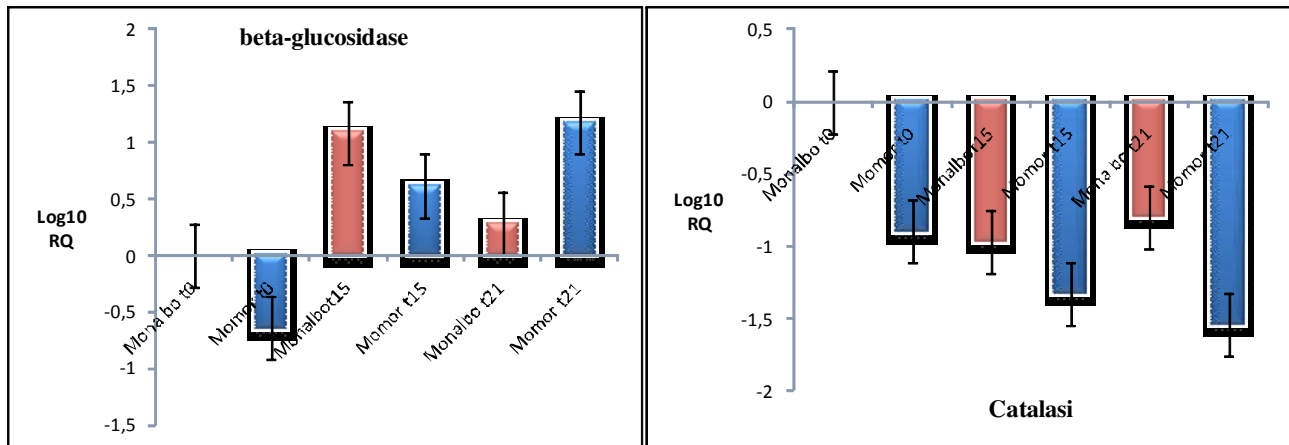


Fig. 9 .Analisi di espressione mediante Real Time Pcr dei geni Beta-glucosidase e Catalasi

In entrambe le tesi il gene che codifica per la Catalasi ha mostrato una sottoespressione al momento dell'inoculazione. Nel genotipo suscettibile l'espressione aumenta a 15 DPI decrescendo a 21 DPI. Mentre nel genotipo resistente è sempre sottoespresso a livelli via via maggiori. Il gene che codifica per la Beta-glucosidase, invece, a 0 DPI è sottoespresso nel genotipo resistente per poi essere sovraespresso a 15 e 21 DPI. Nel genotipo suscettibile il gene è sovraespresso in tutti e tre tempi, ma l'espressione aumenta considerevolmente a 15 DPI per poi diminuire drasticamente a 21 DPI. L'osservazione delle variazioni geniche è stato utile a stabilire il tempo ottimale per la raccolta dei campioni da sottoporre ad ulteriore analisi.

## 4.2 Analisi trascrizionale del trascrittoma del pomodoro nell'interazione con il Forl

### 4.2.1 Esperimento microarray

Per valutare la risposta al processo di infezione dei genotipi è stata effettuata un'analisi globale delle differenze nei profili di trascrizione tra il genotipo resistente e il genotipo suscettibile a Forl.

A questo scopo sono state effettuate otto ibridazioni microarray effettuando due repliche biologiche per ogni campione di Momor inoculato, Momor non inoculato, Monalbo inoculato, Monalbo non inoculato prelevati a 15 giorni dopo l'inoculazione. Sono riportati nella tab.8 le quattro tesi sperimentali dei campioni ibridizzati.

Tab. 8. Visualizzazione schematica degli esperimenti microarray

Esperimento microarray		Campioni	
Prima esperimento	Genotipo resistente inoculato	VS	Genotipo resistente non inoculato
Secondo esperimento	Genotipo suscettibile inoculato	VS	Genotipo suscettibile non inoculato
Terzo esperimento	Genotipo resistente inoculato	VS	Genotipo suscettibile inoculato
Quarto esperimento	Genotipo resistente non inoculato	VS	Genotipo suscettibile non inoculato

Dopo l'acquisizione del dato per ogni singolo esperimento è stata effettuata la normalizzazione risultati microarray confrontando diverse metodologie. Il risultato ritenuto più idoneo per effettuare le tre successive analisi è stato ottenuto utilizzando i valori negativi per sottrarre il background.

Sono stati considerati geni differenzialmente espressi quelli che presentavano un p-value  $\leq 0,05$  dall'analisi del t-test dei dati normalizzati; poiché piccole variazioni di espressione genica possono essere alla base delle differenze del processo di infezione nelle due linee isogeniche, i trascritti differenzialmente espressi non sono stati ulteriormente filtrati.

Una volta identificati i geni la cui espressione è risultata significativamente differente, il passo successivo è stato quello di reperire tutte le informazioni relative alla loro funzione biologica.

I geni differenzialmente espressi per ogni esperimento, infatti, sono stati confrontati con i database dell'NCBI (National Center for Biotechnology Information), dell'Unigene (SGN) e del TIGR. È indicata in tabella 9 la descrizione del gene combinando i dati di annotazione del database dell'NCBI e TIGR.

Tab. 9. Elenco dei trascritti differenzialmente espressi nei quattro esperimenti microarray

ID	Annotazione NCBI Confronto Monalbo inoculato VS Monalbo non inoculato
TC212955_1034_37_S	Omologia del 86% <i>Nicotiana tabacum</i> mRNA for alpha-N-acetylglucosaminidase (predicted protein P. trichocarpa 73.3 %- alpha-N-acetylglucosaminidase family / NAGLU family <i>A. thaliana</i> 66.2 %)
TC199766_1144_37_S	Omologia del 99% <i>S.lycopersicum</i> DNA sequence from clone LE_HBa-72F6 on chromosome 4,
TC200403_411_40_S	<i>Nicotiana tabacum</i> NtmybA2 mRNA for Myb, complete cds 90% (myb-like DNA-binding domain containing protein Z. mays)
TC202092_834_39_S	proteina sconosciuta (al 95% di similarità con est infect tomato, root, di <i>Phithphora parassitica</i> in tomato)
TC192485_1080_38_S	Omologia del 71% con proteina di <i>V. vinifera</i> implicata nei processi ossidativi
TC200104_69_40_S	Omologia del 100% con proteina <i>V. Vinifera</i> (poliA polimerasi dominio conservato)
TC205964_15_40_S	UniRef100_Q9SE08 Cluster: Cystatin; n=1; <i>Solanum lycopersicum</i> Rep: Cystatin - <i>Solanum lycopersicum</i> (Tomato) ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ), complete
TC214429_255_38_S	<i>Solanum lycopersicum</i> con cromosoma 5 bac C05SLM0118J18
TC202590_2434_40_S	Omologia del 77,8% <i>A. thaliana</i> di proteina dehydration-responsive family

TC194791_1588_41_X2	protein(dominio conservato: binding proteins-Putative methyltransferase) <i>Lycopersicon esculentum</i> 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase (dominio conservato: Aspartate amino transferase family)
TC201994_449_40_S	Omologia del 83% a <i>Vitis Vinifera</i> (dominio conservato: Glycosyltransferases catalyze the transfer of sugar moieties-LPS heptosyltransferase)
TC195972_898_40_S	Omologia del 79,9% <i>A. thaliana</i> c102530 ( PHD, PHD-finger)
TC199937_683_36_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL3144E07, HTC in root ( <i>F.oxyporum</i> race2-treated tomato roots 2-month-old).
TC200932_1460_40_S	Omologia del 81,4% con protein kinase family protein <i>A. thaliana</i> ( domini conservati: Protein Kinases, catalytic domain e smart00221, STYKc, Protein kinase; unclassified specificity).
TC195781_1143_40_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1053AB02 (omologia 88,3% PMDH1 (Peroxisomal Nad-Malate Dehydrogenase 1)
TC196238_871_35_S	Omologia del 99% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2005L03, HTC in fruit
TC214505_687_39_S	Omologia del 100% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2011C17, HTC in fruit
TC201532_2199_36_S	Omologia del 94% <i>Lycopersicon esculentum</i> clone 132795F, mRNA sequence ( 79,2% glycoside hydrolase family 28 protein / polygalacturonase (pectinase) family protein <i>A. thaliana</i> proteine conservate= c110049, Glycosyl hydrolases family 28)
TC204827_552_40_S	Omologia del 100% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA clone cLES20J6, mRNA sequence.
TC212292_883_39_S	Omologia del 98% <i>Solanum lycopersicum</i> strain Heinz 1706 clone hba-24o6, complete sequence
TC211196_552_34_X2	Omologia del 97% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2006H19 (70,9% leucine-rich repeat family protein (LRR) in <i>A. thaliana</i> protein)
TC191837_1444_37_S	Omologia del 99% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2034C15, HTC in fruit
TC209944_261_40_S	<i>Lycopersicon esculentum</i> clone 114203R, mRNA sequence(domini conservati: almodulin binding protein-like)
TC211509_1242_35_S	unknown
TC216196_628_38_S	unknown
TC214959_591_40_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1059BB02, HTC in leaf (93% <i>Vitis vinifera</i> dominio conservato Transcription elongation factor Elf1 like)
TC216526_1004_35_S	Omologia del 99% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1010AC09
TC197778_1081_38_S	Omologia del 80% <i>Ricinus communis</i> calcium ion binding protein, putative, mRNA e omologia del 74% <i>Arabidopsis thaliana</i> calcium-binding EF-hand family protein (AT1G54450) mRNA, complete cds
TC212050_674_40_S	100% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1029BC04, HTC in leaf(proteine conservate S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases)
TC214537_583_40_S	Omologia del 99% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1078DB08 (RNA samples for cDNA library construction con <i>Fusarium oxysporum</i> )- (hypothetical protein isoform 1 <i>V. vinifera</i> 66.5 proteine conservate oxygenase superfamily related dioxygenases)
TC199342_561_40_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1007BC11, HTC in leaf-SRG1 (senescence-related gene 1);
NP1427425_333_38_S	unknown
TC214670_1394_40_S	Omologia del 97% EST Infected Tomato roots <i>Phytophthora parasitica</i>
TC204202_634_36_S	unknown
TC202728_672_35_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom leaf- <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA clone LEFL1053BF09 5, mRNA sequence
TC192023_936_40_S	Omologia del 92% <i>Solanum tuberosum</i> partial mRNA for putative cadmium/zinc-transporting ATPase (hma1 gene) - HMA1 (Heavy metal ATPase 1
TC213872_550_35_S	Omologia del 96% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2013M14, HTC in fruit (hypothetical protein <i>V. Omologia del 72.9 % V. vinifera</i> - eukaryotic translation initiation factor 2B family protein / eIF-2B family protein <i>A. thaliana</i> 68.2 %)
TC216769_325_40_S	<i>Solanum lycopersicum</i> DNA, chromosome 8, clone: C08HBa0040B24, complete sequence
TC213278_459_40_S	Omologia del 98% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA
TC209554_468_40_S	Omologia dell'86% <i>Nicotiana tabacum</i> mRNA for alpha-N-acetylglucosaminidase (predicted protein <i>P. trichocarpa</i> 73.3 %- alpha-N-acetylglucosaminidase family / NAGLU family <i>A. thaliana</i> 66.2 %)
TC216131_622_40_S	Omologia del 99% <i>S.lycopersicum</i> DNA sequence from clone LE_HBa-72F6 on chromosome 4,
TC212955_1034_37_S	<i>Nicotiana tabacum</i> NtmybA2 mRNA for Myb, complete cds

ID	Annotazione NCBI Confronto Momor inoculato VS Momor non inoculato
TC199766_1144_37_S	Omologia del 99% <i>S.lycopersicum</i> DNA sequence from clone LE_HBa-72F6 on chromosome 4,
TC200403_411_40_S	<i>Nicotiana tabacum</i> NtmybA2 mRNA for Myb, complete cds (myb-like DNA-binding domain containing protein Z. mays 74.6 % domini conservati= SANT, N-CoR and TFIIB' DNA-binding domains)
TC202092_834_39_S	proteina sconosciuta ( 95% di similarità con est infect tomato, root, di <i>Phithphora parassitica</i> in tomato
TC200104_69_40_S	100% omologia proteina <i>V. Vinifera</i> (Dominio conservato:poli A polimerasi)
TC211863_715_40_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1092CD01 (Micro-Tom leaves treated with <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> -unknown protein A. <i>thaliana</i> 76.4 %)
TC205842_428_35_S	unknown
TC198033_839_35_S	<i>Solanum lycopersicum</i> chromosome 5 clone C05HBa0196G23
TC197420_681_35_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1090CA06 (Micro-Tom leaves treated with <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> )
TC194838_646_40_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1032DG12
TC193146_722_35_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1080CA07 (predicted protein P. <i>trichocarpa</i> 94.5%- ribose-phosphate pyrophosphokinase, putative / phosphoribosyl diphosphate synthetase, putative A. <i>thaliana</i> 89.6 %)
TC193881_607_39_X2	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2004D15
TC201844_85_35_S	<i>Solanum tuberosum</i> clone 021F10 hypothetical protein mRNA
TC208835_686_37_S	<i>Solanum lycopersicum</i> chromosome 11 clone C11HBa0323C14
TC193819_724_38_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1086AB12 (Micro-Tom leaves treated with cucumber mosaic virus, <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
TC199466_238_41_S	unknown
TC197866_862_37_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2012H15, HTC in fruit 99% (PREDICTED: hypothetical protein <i>V. vinifera</i> 81.2%, phosphatidyl serine synthase family protein A. <i>thaliana</i> 78.8% Dominio conservato: pfam03034, PSS, Phosphatidyl serine synthase)
TC208350_524_38_S	Omologia del 98% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1001CC11, HTC in leaf (PREDICTED: hypothetical protein <i>V. vinifera</i> 76.0%, unknown protein A. <i>thaliana</i> 72.4 % Dominio conservato cl00428, UPF0061, Uncharacterized ACR, YdiU/UPF0061 family)
TC202590_2434_40_S	Omologia del 77,8% <i>A.thaliana</i> di proteina dehydration-responsive family protein(domini conservati:NAD(P)(+)-binding proteins-Putative methyltransferase)
TC196589_1568_39_S	unknown
TC204452_685_40_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1090DD08 (predicted protein <i>P. trichocarpa</i> 80.0% e PREDICTED: hypothetical protein <i>V. vinifera</i> 80.0 - phospholipase A2 beta, secretory low molecular weight A. <i>thaliana</i> 63.9 %- Dominio conservato: PLA2_plant, PLA2_plant: Plant-specific sub-family of Phospholipase A2)
TC201994_449_40_S	Omologia del 83% <i>Vitis vinifera</i> (Glycosyltransferase catalyze the transfer of sugar moieties-LPS heptosyltransferase)
TC195972_898_40_S	Omologia del 87% <i>P. trichocarpa</i> - omologia del 79,9% <i>A. thaliana</i> (PHD, PHD-finger)
TC199937_683_36_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL3144E07, HTC in root
TC200388_735_37_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1045DC12 (Micro-Tom leaves treated with cucumber mosaic virus, <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> ( EMB1644 (Embryo Defective 1644) )
TC200932_1460_40_S	Omologia del 81,4% con protein kinase family protein a. <i>A. thaliana</i> ( domini conservati: cl09925, PKc_like, Protein Kinases, catalytic domain e smart00221, STYKc, Protein kinase; unclassified specificity.
TC194490_1039_37_S	unKnown
TC196238_871_35_S	Omologia del 99% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2005L03, HTC in fruit (
TC214505_687_39_S	100% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2011C17, HTC in fruit
TC213494_959_39_S	Omologia del 99% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2002AE08, HTC in fruit (hypothetical protein, partial <i>V. vinifera</i> 88.0%- dihydropyrimidinase / DHPase / dihydropyrimidine amidohydrolase / hydantoinase (PYD2) <i>A. thaliana</i> 82.6)
TC201568_1592_37_S	Omologia del 98% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1034CD01, HTC in leaf (ALDH3H1 (aldehyde dehydrogenase 4)
TC201532_2199_36_S	Omologia del 94% <i>Lycopersicon esculentum</i> clone 132795F, mRNA sequence ( 79,2% glycoside hydrolase family 28 protein / polygalacturonase (pectinase) family protein A. <i>thaliana</i> proteine conservate cl10049, Glycosyl hydrolase family 28)
TC200064_636_37_S	parziale omologia con <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2025H07, HTC in fruit



TC194047_702_41_X2	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1029CA02, HTC in leaf (predicted protein <i>P. trichocarpa</i> 79.6%, UCH3; ubiquitin thiolesterase <i>A. thaliana</i> 73.8%)
TC212292_883_39_S	Omologia del 98% <i>Solanum lycopersicum</i> strain Heinz 1706 clone hba-24o6, complete sequence
TC214569_358_38_S	<i>Solanum lycopersicum</i> chromosome 5 clone C05HBa0210G09, complete
TC192990_1102_40_S	omologia parziale con Soybean clone JCVI-FLGm-18G24 unknown mRNA
TC202246_638_38_S	unknown
TC201462_657_35_S	unknown
TC202214_1086_38_S	unknown
TC211196_552_34_X2	Omologia del 97% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2006H19 (70,9% leucine-rich repeat family protein in <i>A. thaliana</i> ptoeine conservate Leucine-rich repeat (LRR) protein)
TC203102_641_38_S	Omologia del 99% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1035AC06 (cyclin family protein <i>A. thaliana</i> 76.4 % dominio conservato: Cdk activating kinase (CAK)/RNA polymerase )
TC194124_1071_39_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1062AE04 (predicted protein <i>P. trichocarpa</i> 77.3%, unknown protein <i>A. thaliana</i> 68.2% dominio conservato: Esterases and lipases, Hydrolases of the alpha/beta superfamily )
TC202886_700_40_S	EST595084 <i>P. infestans</i> -challenged potato leaf, incompatible reaction <i>Solanum tuberosum</i> cDNA clone BPLI13124 5' end (ATAN11 (anthocyanin11); nucleotide binding <i>A. thaliana</i> 92.2% donimi conservati cl02567, WD40, WD40 domain)
TC203568_476_40_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: FC13BB04, HTC in fruit.
TC195856_617_36_S	Omologia del 96% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2009B09, HTC in fruit.
TC191837_1444_37_S	99% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2034C15, HTC in fruit (80,2% predicted: hypothetical protein non domini conservati)
TC201460_565_35_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL3065O09, HTC in root
TC204292_2125_39_S	<i>Solanum tuberosum</i> cellulose synthase (StCesA1) mRNA, partial cds
TC207292_328_36_S	unknown
TC208960_654_35_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1051BD08, HTC in leaf
TC205302_1001_38_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1015DC07
TC209729_596_36_X2	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL3034G17, HTC in root.
TC194625_652_40_S	unknown
TC191895_2163_35_S	unknown
TC213156_733_39_X2	Omologia parziale con <i>Vitis vinifera</i> hypothetical protein LOC100260359 (LOC100260359), mRNA
TC213282_758_35_S	unknown
TC209944_261_40_S	<i>Lycopersicon esculentum</i> clone 114203R, mRNA sequence. Hypothetical protein <i>V. vinifera</i> 79.7 %. Domini conservati: Calmodulin_bind, Calmodulin binding protein-like)
TC199216_399_40_S	<i>Lycopersicon esculentum</i> clone 114203R, mRNA sequence(hypothetical protein <i>V. vinifera</i> 79.7 %-Domini conservati:Calmodulin_bind, Calmodulin binding protein-like)
TC208878_909_37_S	Omologia del 99% con AK328483.1 (predicted protein <i>P. trichocarpa</i> 89.0 %, SPL8 (squamosa promoter binding protein-like 8); DNA binding <i>A. thaliana</i> 54.7% domini conservati pfam03110, SBP, SBP)
TC193244_782_35_S	unknown
TC196558_739_37_S	Omologia del 97% <i>Nicotiana attenuata</i> GAL83 mRNA, partial cds.
TC200526_421_35_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2051I08, HTC in fruit
TC197739_30_34_X2	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: FC19CD08, HTC in fruit (ATB5-A Cytochrome b5 A). Dominio conservato: Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain
TC203196_273_41_X2	unknown
TC192047_352_35_S	<i>Lycopersicon esculentum</i> clone 133274R, mRNA sequence ( hypothetical protein <i>V. vinifera</i> 94.5%, AtRABA4a ( <i>Arabidopsis</i> Rab GTPase homolog A4a); GTP binding <i>A. thaliana</i> 91.0%)
TC213996_289_39_X2	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1021DH03, HTC in leaf.
TC193232_318_40_S	unknown
TC204431_732_36_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2043J01, HTC in fruit. (SAG18 (senescence associated gene 18)
TC213191_491_35_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2007N14, HTC in fruit.
TC201726_555_40_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1006AD06, HTC in leaf.100%
TC197987_1950_37_S	<i>Solanum lycopersicum</i> chromosome 2 clone C02HBa0090O01, complete
TC207094_544_35_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL3167N21, HTC in root.

TC193447_1144_36_S	<i>Lycopersicon esculentum</i> homogentisate 1,2-dioxygenase (HGO) mRNA,
TC196660_348_40_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL3140B15, HTC in root.
TC192024_1257_38_S	<i>Lycopersicon esculentum</i> clone 133624F, mRNA sequence.
TC196783_697_35_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1073CC01, HTC in leaf.
TC215788_751_37_S	<i>Solanum lycopersicum</i> chromosome 2 clone C02HBa0090O01, complete
TC201525_569_35_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1065CC09, HTC in leaf.
TC216480_317_37_S	<i>Solanum lycopersicum</i> chromosome 9 clone C09HBa0026I24, complete sequence
TC215183_449_38_X4	unknown
TC202521_862_35_S	unknown
TC213445_601_35_S	<i>Solanum lycopersicum</i> chromosome 3 clone C03HBa0043F15, complete
TC203510_1168_35_S	<i>Populus trichocarpa</i> predicted protein, mRNA.
TC210333_644_39_X2	parziale omologia con <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1009CC11, HTC in leaf
TC201081_8_40_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1049BE09, HTC in leaf.
TC196325_582_35_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1059DH05, HTC in leaf 98% (RRP41 (Ribosomal RNA Processing 41); 3'-5'-exoribonuclease/ RNA binding A. thaliana 84.1% domini conservati pfam01138, RNase_PH, 3' exoribonuclease family, domain 1)
TC192327_3126_39_S	Omologia del 99% <i>Lycopersicon esculentum</i> clone 133865R, mRNA sequence (transducin family protein / WD-40 repeat family protein A. thaliana 72.9%)
TC212940_1119_36_S	Omologia del 99% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL3159N09, HTC in root (hypothetical protein V. vinifera 87.9%, SNRK2-5/SNRK2.5/SRK2H (SNF1-related protein kinase 2.5); kinase A. thaliana 84.8%)
TC207321_688_40_S	Omologia del 99% <i>Solanum lycopersicum</i> chromosome 12 clone LE_HBa-144B17
TC194088_670_36_S	Omologia del 100% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1023BD10, HTC in leaf (unknown protein A. thaliana 80.7%))
TC207581_594_35_X2	<i>Lycopersicon esculentum</i> clone 133066F, mRNA sequence
TC195227_736_36_S	unknown
TC212409_508_40_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1066CF01, HTC in leaf 100%( predicted protein P. trichocarpa 79.4%, thaumatin-like protein, putative A. thaliana 73.8 %)
TC215773_600_40_S	Omologia del 84% <i>Lycopersicon esculentum</i> clone 132815F, mRNA sequence-protein kinase, putative A.thaliana 74.6%
TC210524_1014_35_S	Omologia del 99% <i>S.lycopersicum</i> DNA sequence from clone LE_HBa-107D6 on chromosome 4, complete sequence
TC199712_20_40_S	Omologia del 99% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1023AB12, HTC in leaf (AHB2 (Non-Symbiotic Haemoglobin 2) A. thaliana 75.3%)
TC191780_2285_40_S	Omologia del 94% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2011G12, HTC in fruit (hypothetical protein V. vinifera 84.0%, ATGH9C2 ( <i>Arabidopsis Thaliana</i> Glycosyl Hydrolase 9C2); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds A. thaliana 81.8%)
TC204692_417_39_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1005CB10, HTC in leaf 100% (dxr protein Z. mays 94.0%,
TC206624_650_35_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1005CB10, HTC in leaf
TC197225_832_35_S	Omologia del 99% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2027J09, HTC in fruit (protein kinase family protein / peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein A. thaliana 68.4%)
TC194754_101_40_S	unknown
TC208776_91_41_X2	omologia con <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1002CG04, HTC in leaf (unknown protein A. thaliana 84.6%)
TC209735_174_41_X2	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1027AF02, HTC in leaf 95% (hypothetical protein V. vinifera 79.7%, protein kinase family protein A. thaliana 76.0%)
TC201022_680_35_S	Omologia del 99% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1010BA06, HTC in leaf (kelch repeat-containing F-box family protein A. thaliana 60.8% -Dominio conservato: cl02701, Kelch_1, Kelch motif)
TC199298_737_39_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: FC25BB08, HTC in fruit
TC201130_55_41_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1024CB11, HTC in leaf
TC194522_19_36_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1020DH02, HTC in leaf
TC194491_1073_40_S	Omologia del 99% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1063BC12, HTC in leaf (predicted protein P. trichocarpa 46.1%)
TC202718_1410_39_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1025DG04, HTC in leaf
TC212594_518_37_X2	unknown
TC211208_407_37_S	unknown
TC197849_292_41_X2	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1016CD03, HTC in leaf
TC214494_398_38_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1047BF03, HTC in leaf

TC210172_954_34_X2	<i>Lycopersicon esculentum</i> clone 132714F, mRNA sequence
TC214062_509_40_S	<i>Solanum tuberosum</i> cDNA clone 6740 3', mRNA sequence
TC202669_625_35_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1053BB08, HTC in leaf (hypothetical protein V. vinifera 89.0%, ATN1; kinase/ protein serine/threonine/tyrosine kinase A. thaliana )
TC213930_803_38_S	parziale omologia con <i>Ricinus communis</i> Extensin-3 precursor, putative, mRNA
TC202763_907_35_S	unknown
TC196907_635_40_S	Omologia del 99% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2055C23, HTC in fruit (ATCDPK2 (calcium-dependent protein kinase 2); calmodulin-dependent protein kinase/ kinase A. thaliana 80.0%)- Domini conservati Serine/Threonine protein kinases, catalytic domain. Phosphotransferases of the serine.
TC206317_480_40_S	unknown
TC197930_735_35_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1032AE10, HTC in leaf 99% (predicted protein P. trichocarpa 82.3%, CBS domain-containing protein A. thaliana 79.0 %)
TC204145_1772_40_S	omologia parziale con <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL3148P04, HTC in root
TC211836_182_40_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2037O18, HTC in fruit
TC212050_674_40_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1029BC04, HTC in leaf(RNA samples for cDNA library construction con <i>oxysporum</i> f. sp. <i>lycoperrici</i> )-(predicted protein P. trichocarpa 69.8 % proteine conservate S-adenosylmethionine-dependent ethyltransferases)
TC203310_477_40_S	parziale omologia con <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1002DB10, HTC in leaf (ribophorin II (RPN2) family protein A. thaliana 64.7%)
TC195930_389_40_S	unknown
TC206701_1523_38_S	unknown
TC205706_603_40_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1015DC01, HTC in leaf (GAUT4 (Galacturonosyltransferase 4); polygalacturonate 4-alpha-galacturonosyltransferase/ transferase, transferring glycosyl groups A. thaliana 73.2% Domini conservati: GT8 like1 represents a subfamily of GT8 with unknown function)
TC204495_570_40_S	<i>Lycopersicon esculentum</i> clone 114152R, mRNA sequence
TC200024_633_40_S	Omologia del 99% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2050F04, HTC in fruit (dehydration-responsive family protein A. thaliana 64.7 %. Domini conservati: NADB Rossmann, Rossmann-fold NAD(P)(+)-binding proteins
TC212805_1164_35_S	unknown
TC204202_634_36_S	unknown
TC202728_672_35_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cv. Micro-Tom leaf <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA clone LEFL1053BF09 5', mRNA sequence
TC202660_511_35_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL3046K13, HTC in root
TC195230_1403_38_S	unknown
TC203699_798_35_S	Omologia del 99% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1056CC02, HTC in leaf (hypothetical protein V. vinifera 65.9%, F-box family protein A. thaliana 51.9% Domini conservati cl02535, F-box, F-box domain)
TC196193_601_37_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1050DE12, HTC in leaf
TC201949_488_40_S	<i>Solanum lycopersicum</i> chromosome 2 clone C02HBa0320D04, complete sequence
TC211922_1634_40_S	unknown
TC209339_369_38_S	unknown
TC215515_431_40_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL3154F23, HTC in root
TC192023_936_40_S	Omologia del 92% <i>Solanum tuberosum</i> partial mRNA for putative cadmium/zinc-transporting ATPase (hma1 gene) - HMA1 (Heavy metal ATPase 1)
TC197442_541_40_X3	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2055E06, HTC in fruit
TC216769_325_40_S	<i>Solanum lycopersicum</i> DNA, chromosome 8, clone: C08HBa0040B24, complete sequence
TC208910_414_36_X2	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1004BH04, HTC in leaf
TC213278_459_40_S	Omologia del 98% <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA roots
TC209554_468_40_S	Omologia con EST548605 tomato flower, 3 - 8 mm buds <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA
TC211610_501_40_S	unknown
TC216131_622_40_S	<i>Lycopersicon esculentum</i> maturing fruit <i>Solanum lycopersicum</i> cDNA clone FA32BE01 5', mRNA sequence
TC212955_1034_37_S	Omologia dell' 86% <i>Nicotiana tabacum</i> mRNA for alpha-N-acetylglucosaminidase (predicted protein P. trichocarpa 73.3 %- alpha-N-acetylglucosaminidase family / NAGLU family A. thaliana 66.2 %)
<b>ID</b>	<b>Annotazione NCBI Confronto Momor non inoculato VS Monalbo non inoculato</b>
TC204871_817_35_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cultivar Asc/Asc glutathione S-transferase-like

TC201057_531_38_S	omologia del 77,8% <i>A. thaliana</i> di proteina dehydration-responsive family protein(domini conservati=NAD(P)(+)-binding proteins-Putative methyltransferase)
TC216196_628_38_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1030DA02, HTC in leaf Omologia del 92% <i>P. infestans</i> -challenged potato leaf, (domini conservati: Esterase lipase, Esterases and lipases)
TC206317_480_40_S	parziale omologia Soybean clone JCVI-FLGm-18F22 unknown mRNA (
<b>ID</b>	<b>Annotazione NCBI Confronto Momor inoculato VS Monalbo inoculato</b>
TC212955_1034_37_S	Omologia del 86% <i>Nicotiana tabacum</i> mRNA for alpha-N-acetylglucosaminidase (predicted protein P. trichocarpa 73.3 %- alpha-N-acetylglucosaminidase family / NAGLU family <i>A. thaliana</i> 66.2 %)
TC199766_1144_37_S	Omologia del 99% <i>S.lycopersicum</i> DNA sequence from clone LE_HBa-72F6 on chromosome 4,
TC200403_411_40_S	Omologia del 92% <i>Nicotiana tabacum</i> NtmybA2 mRNA for Myb, complete cds. (myb-like DNA-binding domain containing protein Z. mays 74.6%-Domini conservati: cd00167, SANT, N-CoR and TFIIB' DNA-binding domains
TC202092_834_39_S	proteina sconosciuta (al 95% di similarità con est infect tomato, root, di Phithphora parassitica in tomato)
TC192485_1080_38_S	Omologia del 71% di omologia con proteina di V. vinifera implicata nei processi ossidativi
TC200104_69_40_S	Omologia del 100% omologia proteina V. Vinifera (poliA polimerasi dominio conservato)
TC205964_15_40_S	UniRef100_Q9SE08 Cluster: Cystatin; n=1; <i>Solanum lycopersicum</i> Rep: Cystatin -
TC214429_255_38_S	<i>Solanum lycopersicum</i> (Tomato) ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ), complete omologia <i>solanum lycopersicum</i> con cromosoma 5 bac c05slm0118J18
TC211863_715_40_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1092CD01 (Micro-Tom leaves treated with <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (unknown protein <i>A. thaliana</i> 76.4 %)
TC205842_428_35_S	<i>Capsicum annuum</i> clone BAC CaCM699L14, complete sequence
TC198033_839_35_S	<i>Solanum lycopersicum</i> chromosome 5 clone C05HBa0196G23, complete sequence
TC197420_681_35_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1090CA06 (Micro-Tom leaves treated with <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> - (predicted protein P. trichocarpa 60.3% )
TC194838_646_40_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1032DG12, HTC in leaf
TC193146_722_35_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1080CA07 (predicted protein P. trichocarpa 94.5%- ribose-phosphate pyrophosphokinase, putative / phosphoribosyl diphosphate synthetase, putative <i>A. thaliana</i> 89.6 %)
TC193881_607_39_X2	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2004D15, HTC in fruit
TC201844_85_35_S	<i>Solanum tuberosum</i> clone 021F10 hypothetical protein mRNA
TC208835_686_37_S	<i>Solanum lycopersicum</i> chromosome 11 clone C11HBa0323C14, complete sequence
TC193819_724_38_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1056BD05 (hypothetical protein V. vinifera 55.0%- chloroplast lumen common family protein <i>A. thaliana</i> 49.9 domini conservati Tetratricopeptide repeat domain)
TC199466_238_41_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1086AB12 (Micro-Tom leaves treated with cucumber mosaic virus, <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> hypothetical protein V. vinifera 47.4 % )
TC197866_862_37_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2012H15, HTC in fruit
TC208350_524_38_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1001CC11, HTC in leaf
TC194881_2539_40_S	Omologia del 96% <i>Lycopersicon esculentum</i> putative permease gene, partial cds;
TC204871_817_35_S	Omologia con <i>Solanum lycopersicum</i> cultivar Asc/Asc glutathione, S-transferase-like protein mRNA, complete cds.
TC202590_2434_40_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL2007G02, HTC in fruit
TC201057_531_38_S	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, clone: LEFL1030DA02,(dehydration-responsive family protein <i>A. thaliana</i> 77.8%-Domini conservati: cl09931, NADB_Rossmann, Rossmann-fold NAD(P)(+)-binding proteins)
TC202085_463_35_X3	parziale omologia <i>Lycopersicon esculentum</i> BAC clone Clemson, <i>Solanum lycopersicum</i> centromere-specific retrotransposon-like
TC212955_1034_37_S	Omologia del 86% <i>Nicotiana tabacum</i> mRNA for alpha-N-acetylglucosaminidase (predicted protein P. trichocarpa 73.3 %- alpha-N-acetylglucosaminidase family NAGLU family <i>A. thaliana</i> 66.2 %)

#### 4.2.1.1 Analisi della variazione di espressione nel tempo

Per analizzare la variazione di espressione genica e per validare l'esperimento microarray ci si è avvalsi della tecnica di Real Time Pcr. Sono stati scelti alcuni geni coinvolti nel processo di resistenza pianta-patogeno evidenziati con l'esperimento Microarray da analizzare nei differenti intervalli di inoculazione (0 DPI, 7 DPI, 15 DPI). In tabella 10 sono riportati i dieci geni su cui è stata condotta l'analisi.

Tab. 10. Sono riportati i geni candidati per l'analisi Real time Pcr e valori di espressione Microarray

Geni	ID	Valori di espressione Microarray
Clone LEF2027J09 (Protein Kinase)	TC197225_832_35_S	-1,088
Aldeide Deidrogenase	TC201568_1592_37_S	1,076
Hma1 gene (cadmium/zinc-transporting ATPase)	TC192023_936_40_S	-0,832
Alfa-N-acetilglucosaminidasi	TC212955_1034_37_S	1,142
Malato Deidrogenasi	TC195781_1143_40_S	0,908
Clone: LEFL3144E07	TC199937_683_36_S	1,048
Glycosiltransferasi	TC201994_449_40_S	1,198
Permeasi	TC194881_2539_40_S	5,274
Glutatione transferasi	TC201057_531_38_S	-0,833
Retrotransposon-like	TC202085_463_35_X3	5,412

L'analisi di espressione ha confermato i risultati microarray per tutti i dieci geni scelti essendo i valori di espressione a 15 DPI concordi nelle due metodologie.

##### 4.2.1.1.1 Validazione dell'esperimento del confronto tra Momor inoculato e Momor non inoculato

Il clone LEF2027J09 che presenta una similarità con una chinasi identificata in *Arabidopsis thaliana* durante il decorso dell'inoculazione ha mostrato una sottoespressione nel genotipo non inoculato che è aumentata significativamente a 7 DPI per poi ritornare ai valori iniziali. Nel genotipo inoculato la sottoespressione è stata via via crescente raggiungendo a 15 DPI il valore di -2.

L'Aldeide Deidrogenasi mostra un andamento molto differente tra il genotipo inoculato e non inoculato in riferimento all'arco temporale dell'inoculazione. Dalla figura n.10 si osserva un che nel genotipo inoculato a 0 DPI il gene ha un'espressione molto bassa (0,022) mentre a 7 DPI l'Aldeide mostra una sottoespressione (0,12) e a 15 DPI una sovra espressione (0,38). Nel campione non trattato il gene manifesta una sottoespressione in tutti e tre tempi fino a raggiungere un valore del -1,638 a 15 DPI.

Il gene hma1 (cadmium/zinc-transporting ATPase) è sottoespresso nel genotipo inoculato in tutti i tre tempi raggiungendo un valore di espressione pari a -1,10 a 15DPI. Nel genotipo non trattato, invece, il gene è poco espresso. Questo andamento di espressione evidenzia che tale gene è espresso quando il genotipo resistente è sottoposto a stress biotico (Fig. 10).

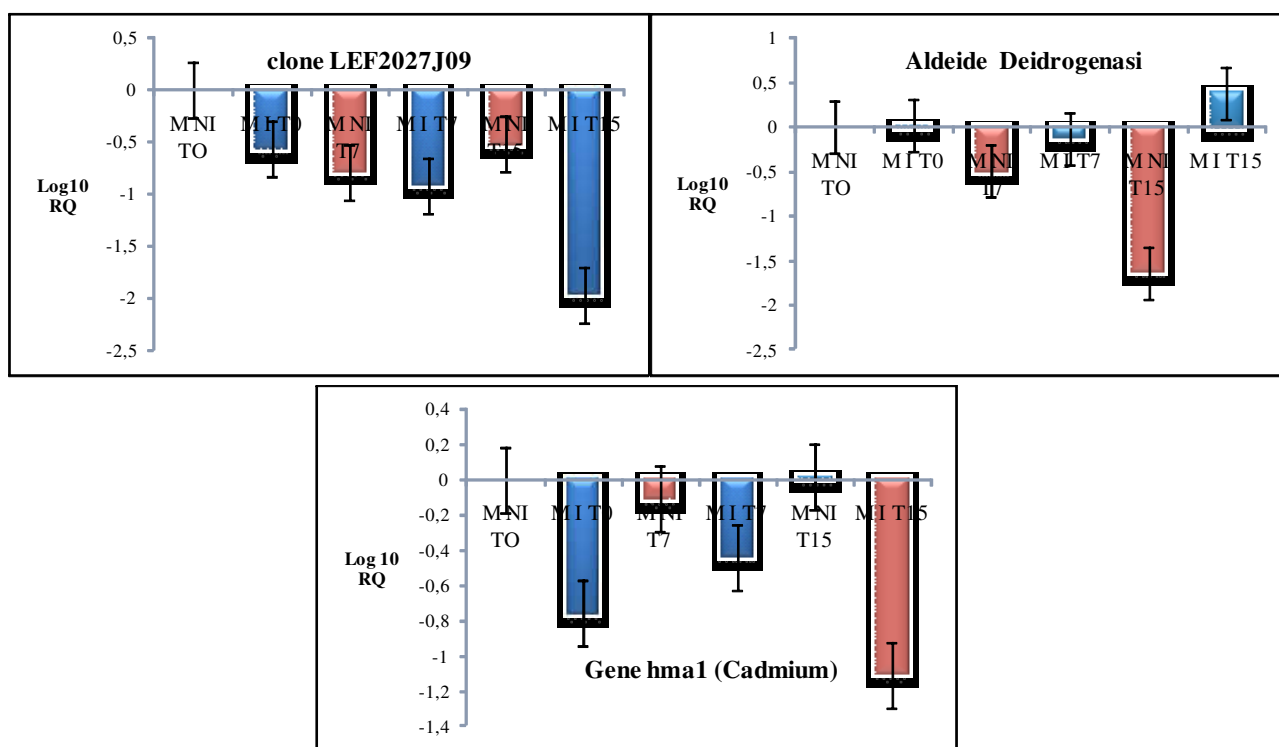


Fig. 10. Analisi di espressione genica mediante Real Time Pcr: clone LEF2027J09, Aldeide Deidrogenasi, e il gene hma1 (cadmium/zinc-transporting ATPase)

#### 4.2.1.1.2 Validazione dell'esperimento del confronto tra Monalbo inoculato e Monalbo non inoculato

I geni analizzati mediante Real Time Pcr dopo aver condotto gli esperimenti microarray del confronto Monalbo inoculato e Monalbo non inoculato sono stati: l'Alfa-N-acetilglucosaminidasi, Malato deidrogenasi, *Solanum lycopersicum* cDNA-clone: LEFL3144E07 e una Glicosiltransferasi.

L'Alfa-N-acetilglucosaminidasi come si evince dalla figura 11 è un gene che mostra una sovra espressione quando il genotipo suscettibile è sottoposto ad inoculazione. Analizzando l'andamento nei tre tempi si nota una significativa riduzione dell'espressione a 7 DPI che comunque risale a 15 DPI. Quando il nostro campione, invece, non è inoculato il gene ha un comportamento opposto. A 15 DPI tale sottoespressione raggiunge un valore di espressione più del doppio rispetto al tempo 7 DPI.

L'espressione del gene "Malato deidrogenasi" ha un andamento simile all'Alfa-N-acetilglucosaminidasi. Quando il genotipo suscettibile è inoculato, infatti, si rileva una sovraespressione del gene con diminuzione dell'espressione all'aumentare dei giorni d'inoculazione. Nel genotipo suscettibile non trattato il gene è sottoespresso mostrando lo stesso andamento dell'Alfa-N-acetilglucosaminidasi.

Il clone LEFL3144E07 nel genotipo suscettibile inoculato è sovraespresso in tutti e tre tempi e tale espressione è abbastanza costante nell'intervallo considerato. Quando il genotipo suscettibile non è sottoposto ad inoculazione si evidenzia una lieve sovraespressione a 7 DPI per poi ridursi di quasi due terzi rispetto al tempo precedente.

La Glicosiltransferasi nel genotipo resistente inoculato è sovraespresso in tutti e tre tempi e la sua espressione non varia con l'aumentar dei giorni dell'inoculazione. Nel genotipo resistente non inoculato mostra avere un'espressione a 7 DPI pari a 0,080 per poi sottoesprimersi mostrando un valore di -0,462 a 15 DPI.

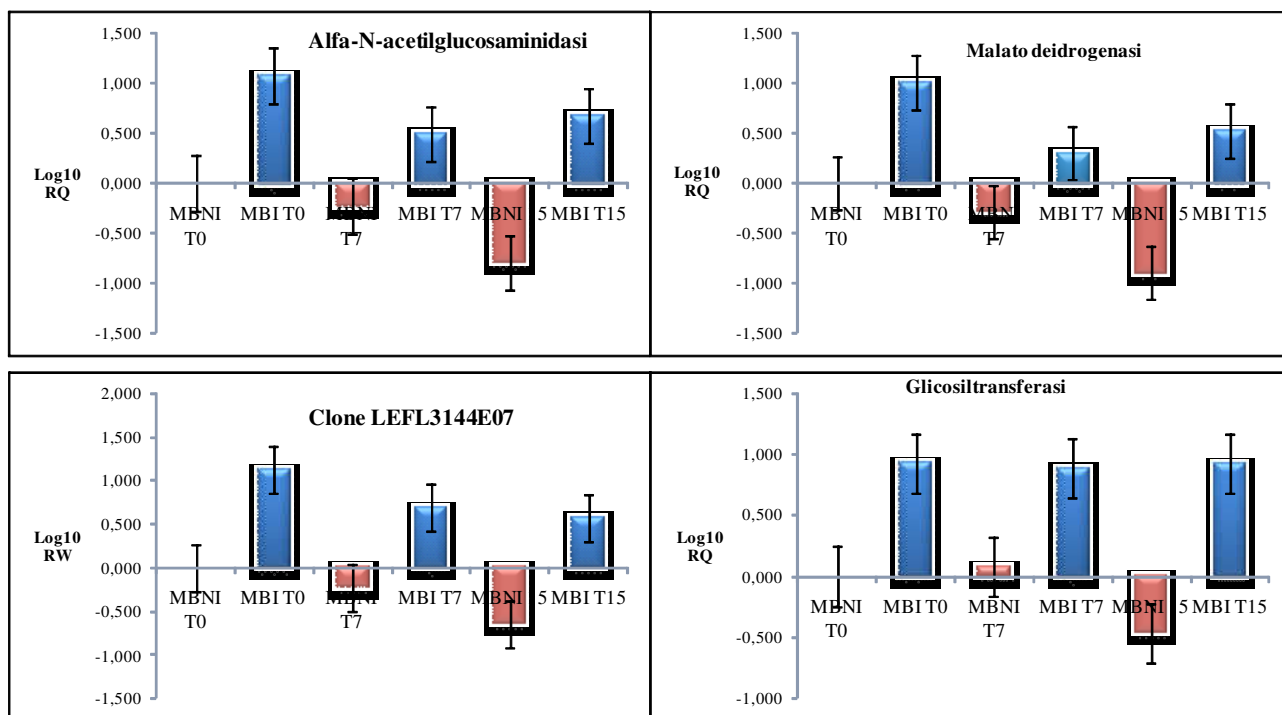


Fig. 11. Analisi di espressione genica mediante Real Time Pcr: Alfa-N-acetilglucosaminidasi, Malato Deidrogenasi e *Solanum lycopersicum* cDNA-clone: LEFL3144E07 e di una Glicosiltransferasi

#### 4.1.1.1.3 Validazione dell'esperimento del confronto tra Momor inoculato e Monalbo inoculato

In questo confronto si è analizzata l'espressione differenziale di una Permeasi, di un Glutazione transferasi e di un *Solanum lycopersicum* centromere-specific retrotransposon-like (Fig. 12).

Il gene permeasi come si evince dal grafico mostra un'espressione differenziale, "up-regulated" nel genotipo resistente. L'andamento dell'espressione è simile nei tre tempi; si rileva un lieve decremento dell'espressione da 0 DPI a 15 DPI. Nel genotipo suscettibile durante il processo d'infezione il gene invece è sottoespresso e tale andamento aumenta con i giorni in maniera crescente negli intervalli considerati.

Sia nel genotipo resistente che in quello suscettibile il gene della Glutazione-transferasi è sottoespresso ma tale sottoespressione è più del doppio in Momor rispetto a Monalbo. Questo comportamento è osservabile in tutti i tempi d'inoculazione saggiati. In particolare è possibile evidenziare che l'espressione genica più bassa avviene a 7 DPI nel genotipo resistente.



Il *Solanum lycopersicum* centromere-specific retrotransposon-like, invece, è altamente espresso nel genotipo resistente. L'andamento è pressoché costante nei tre tempi. Nel genotipo suscettibile il retrotrasposone è lievemente espresso a 7 DPI per poi essere represso a 15DPI.

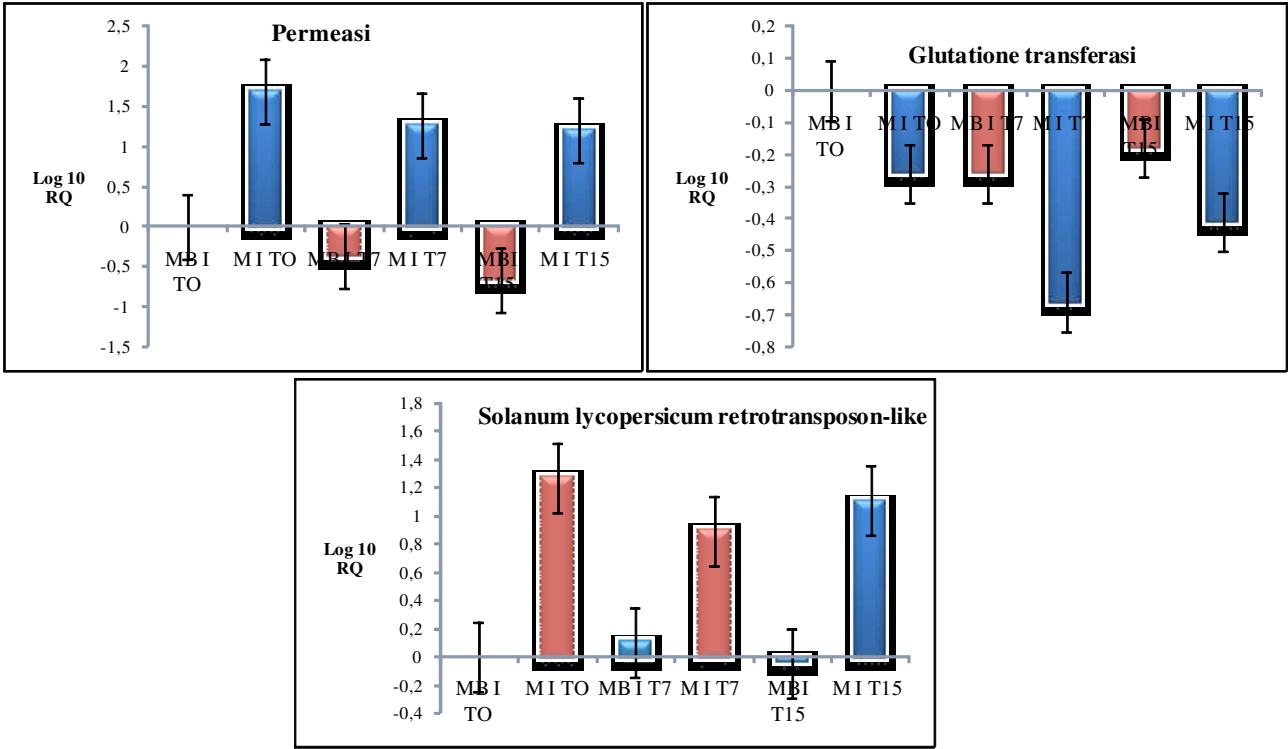


Fig. 12. Analisi di espressione genica mediante Real Time Pcr: Permeasi, Glutathione transferasi e retrotransposon-like posizionato.

## 4.2.2 Analisi Cluster

Un'analisi statistica di raggruppamento genico molto utilizzata per analizzare i dati trascrizionali globali è il “clustering gerarchico” che raggruppa l'espressioni simili partendo da quelle più vicine per poi aggregare man mano a questo gruppo altre espressioni più lontane (Fig. 13).

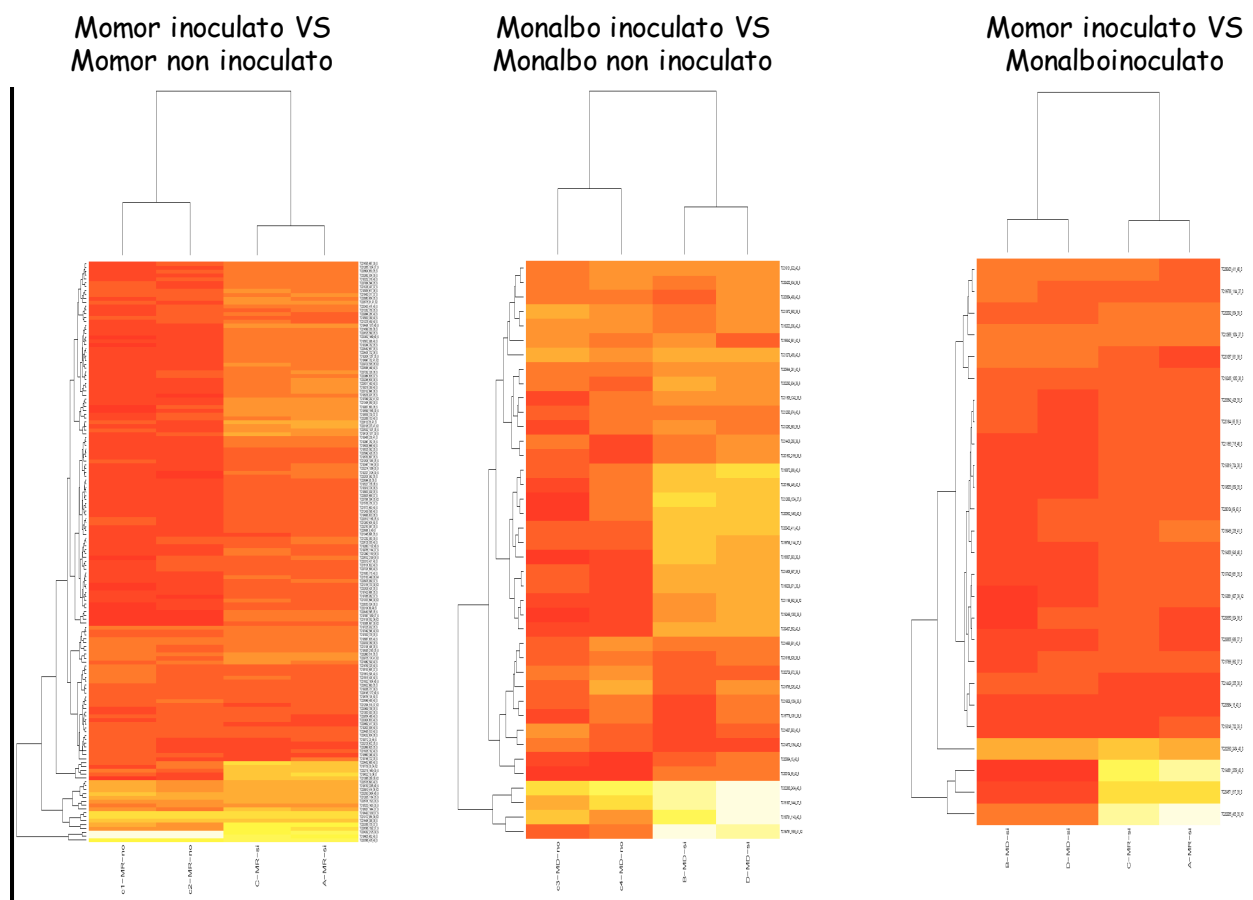


Fig. 13. Analisi statistica “Cluster” dei tre esperimenti Microarray

Con l'utilizzo del programma Genesis sono stati creati tre cluster. Il primo cluster riguarda il confronto tra il genotipo resistente inoculato con il genotipo resistente non inoculato nel quale possiamo evidenziare il primo gruppo che va dal TC201994\_449\_40\_S a TC201525\_569\_35\_S nei quali si evidenziano come trascritti il Cellulosa sintasi (StCesA1), il “clone: LEFL1029CA02” che mostra una similarità con l'ubiquitina tiolasterasi in *A. thaliana* e la kinase family protein. Il secondo gruppo che va dal TC202886\_700\_40\_S a TC213494\_959\_39\_S nel quale si rilevano il

clone LEFL1048BH01 che ha una similarità con “anthocyanin11” e il clone: LEFL2002AE08 che mostra una similarità con “dihydropyrimidine amidohydrolase” (PYD2) in *A. thaliana*. Infine, l’ultimo gruppo che va dal TC202886\_700\_40\_S a TC201568\_1592\_37\_S nel quale sono co-regolati il clone: LEFL1029BC04 che mostra avere una similarità con la metiltransferasi, la “phosphatidylserine synthase”, la glicoside idrolasi e l’aldeide deidrogenasi.

Il cluster relativo al confronto del genotipo suscettibile inoculato con il genotipo suscettibile non inoculato mostra due zone nelle quali i geni sono co-espressi. Nella prima zona si menziona l’ alfa-N-acetilglucosaminidasi, “*Nicotiana tabacum* NtmybA2 mRNA for Myb”, glicosiltransferasi; mentre nella seconda zona si evidenziano “l’aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase” e il malato deidrogenasi.

Il terzo cluster raggruppa i geni differenzialmente espressi nel confronto tra il genotipo resistente inoculato e il genotipo suscettibile inoculato in cui si rilevano in particolare la zona che comprende il TC202085\_463\_35\_X3 e TC194881\_2539\_40\_S dove sono co-regolati un retrotrasposone, il glutathione transferasi e una permeasi.

Nell’esperimento micorarray del confronto dei due genotipi non sottoposti ad inoculazione non si riportano i risultati di questa analisi per il basso numero dei trascritti differenzialmente espressi ottenuti. Questo dato conferma che i due genotipi sono completamente isogenici e che mostrano differenze solo quando sono sottoposti a stress biotico. Per questo motivo per tutte le successive analisi si è proceduto nello stesso modo

Per analizzare in dettaglio la funzione biologica dei trascritti nei sottocluster individuati sono state effettuate diverse analisi di annotazione.

Una prima risorsa bioinformatica utilizzata è stata il programma DAVID (the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) che permette di effettuare un’analisi funzionale di dati trascrizionali e proteici.

Nel confronto tra il genotipo resistente trattato e non trattato sono stati evidenziati sette cluster (Fig. 14) in cui le aree colorate in verde rappresentano i geni ai quali sono note le annotazioni funzionali mentre le aree colorate in nero rappresentano i geni ai quali non è ancora riportata la categoria funzionale di appartenenza. Si evidenzia che nei cluster 2, 4, 5, 6 si ha una presenza elevata di geni senza un’annotazione conosciuta.

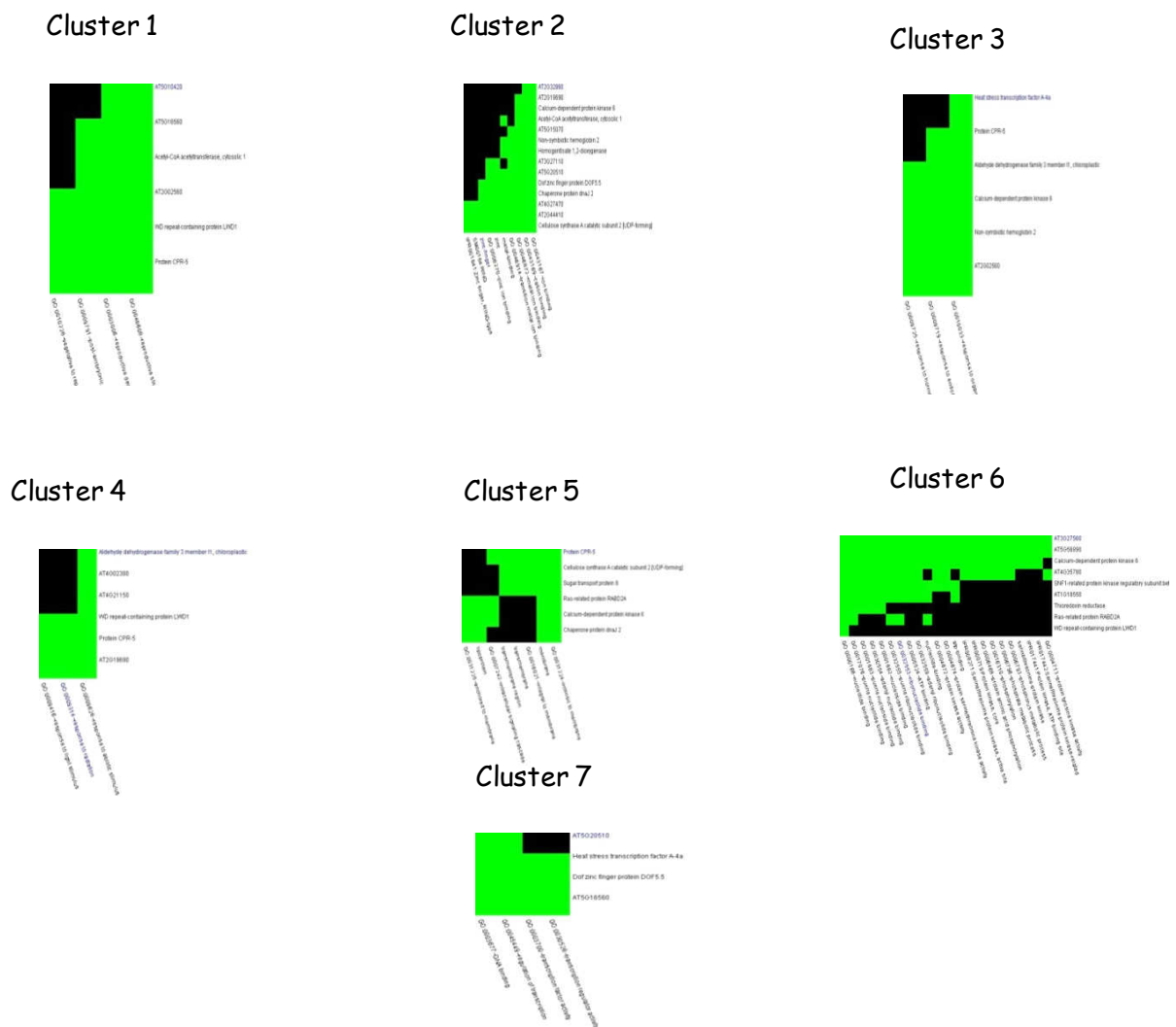


Fig. 14. Analisi cluster funzionali nel confronto Momor inoculato e Momor non inoculato

Nel cluster 1 si evidenziano geni come Acat2 (Acetil-CoA acetiltransferasi) coinvolto nella biosintesi di prodotti metabolici intermedi, il gene CPR-5 (constitutive expression of PR genes 5) che svolge un ruolo fondamentale nella risposta di resistenza ai patogeni e il gene ATAN11 (anthocyanin11). Nel secondo cluster i geni più rappresentativi sono il CPK6 (proteina chinasi calcio dipendente 6) che ha un ruolo principalmente nella regolazione dell'attività della chinasi e nel segnale di trasduzione in processi che riguardano il calcio come secondo messaggero, il CesA2 (cellulosa sintasi) coinvolto nella formazione delle cellule guardia e della sintesi di cellulosa, l'ATJ2 coinvolto in stress ambientali, l'HGO (diossigenasi), il AHB2 (non-symbiotic haemoglobin 2) che svolge un'azione fondamentale nel trasporto di elettroni e viene attivato quanto ci sono condizioni di stress dovuti a ferite o di tipo ossidativo. Nel cluster "risposta a stress esterni" i geni principalmente coinvolti sono l' ALDH3I1 (aldeide deidrogenasi) che è coinvolto nei processi di stress ossidati e l' AT-HSFA4A (heat shock transcription factor).

Nel cluster Stress abiotici si evidenziano l'ALDH3I1 (aldeide deidrogenasi) coinvolto nella tolleranza a stress ossidativi, il CPR-5 (constitutive expression of PR genes 5) che contribuisce alla resistenza a patogeni e l'ATAN11.

Nel cluster 5 si riportano il gene ATJ2 coinvolto in stress ambientali, il gene ARA-5 (*arabidopsis thaliana* responsive to abscisic) e il gene "Sugar transport" che svolge un ruolo principale nel trasporto di zuccheri.

Nel cluster 6 si evidenziano il gene ARA-5, il gene KINB1 che svolge un ruolo principale nel metabolismo dei carboidrati e il gene ntrC (NADPH-tioredoxina reduttasi dipendente)

Nel cluster 7 si menzionano il gene CDF1(Cicling dof factor) e il gene AT-HSFA4A (heat shock transcription factor ) che sono entrambi fattori di trascrizione (Tab. 11).

Tab. 11. Analisi cluster funzionale "David" del confronto tra Momor inoculato e Momor non inoculato.

<b>Cluster 1 Reproductive-Development Process</b>	<b>P-value</b>	<b>Benjamini</b>
vegetative to reproductive phase transition	1.4E-2	9.7E-1
reproductive structure development	3.0E-2	9.8E-1
reproductive developmental process	4.4E-2	9.8E-1
post-embryonic development	1.5E-1	1.0E0
<b>Cluster 2 Metal Binding</b>		
zinc	3.3E-2	9.4E-1
metal-binding	6.3E-2	9.3E-1
cation binding	7.1E-2	1.0E0
ion binding	7.3E-2	9.8E-1
metal ion binding	1.0E-1	9.8E-1
zinc-finger	1.1E-1	9.0E-1
zinc ion binding	2.1E-1	9.9E-1
transition metal ion binding	2.1E-1	9.8E-1
Zinc finger, RING-type	3.3E-1	1.0E0
RING	3.8E-1	1.0E0
<b>Cluster 3 Response to stress</b>		
response to organic substance	1.5E-1	1.0E0
response to endogenous stimulus	2.1E-1	1.0E0
response to hormone stimulus	3.8E-1	1.0E0
<b>Cluster 4 Abiotic Stress</b>		
response to abiotic stimulus	1.6E-1	1.0E0
response to light stimulus	3.1E-1	1.0E0
response to radiation	3.3E-1	1.0E0
<b>Cluster 5 Membrane</b>		
lipoprotein	7.5E-2	8.8E-1
anchored to membrane	1.6E-1	9.0E-1
membrane	5.7E-1	1.0E0
intracellular signaling cascade	5.8E-1	1.0E0
intrinsic to membrane	7.4E-1	1.0E0
transmembrane region	8.4E-1	1.0E0
transmembrane	9.3E-1	1.0E0
integral to membrane	9.7E-1	1.0E0

<b>Cluster 6 Protein Kinase</b>		
protein tyrosine kinase activity	1.8E-1	1.0E0
protein serine/threonine kinase activity	2.1E-1	9.9E-1
Serine/threonine protein kinase, active site	2.6E-1	1.0E0
protein kinase activity	2.8E-1	9.9E-1
Protein kinase, core	3.9E-1	1.0E0
nucleotide-binding	4.0E-1	1.0E0
serine/threonine-protein kinase	4.5E-1	1.0E0
protein amino acid phosphorylation	4.8E-1	1.0E0
Protein kinase, ATP binding site	4.9E-1	1.0E0
atp-binding	5.1E-1	1.0E0
purine nucleotide binding	5.3E-1	1.0E0
phosphorylation	5.5E-1	1.0E0
Serine/threonine protein kinase-related	5.7E-1	1.0E0
nucleotide binding	5.8E-1	1.0E0
purine nucleoside binding	5.9E-1	1.0E0
adenyl nucleotide binding	5.9E-1	1.0E0
nucleoside binding	6.0E-1	1.0E0
phosphate metabolic process	6.1E-1	1.0E0
phosphorus metabolic process	6.1E-1	1.0E0
purine ribonucleotide binding	6.3E-1	1.0E0
ribonucleotide binding	6.3E-1	1.0E0
ATP binding	6.9E-1	1.0E0
adenyl ribonucleotide binding	7.0E-1	1.0E0
<b>Cluster 7 Regulation Transcription</b>		
regulation of transcription	8.9E-1	1.0E0
transcription factor activity	9.3E-1	1.0E0
DNA binding	9.5E-1	1.0E0
transcription regulator activity	9.6E-1	1.0E0

Analizzando il genotipo suscettibile inoculato con il genotipo suscettibile non inoculato si evidenzia la maggiore presenza di geni con annotazione funzionale nota rispetto ai cluster del confronto precedente (Fig. 15)

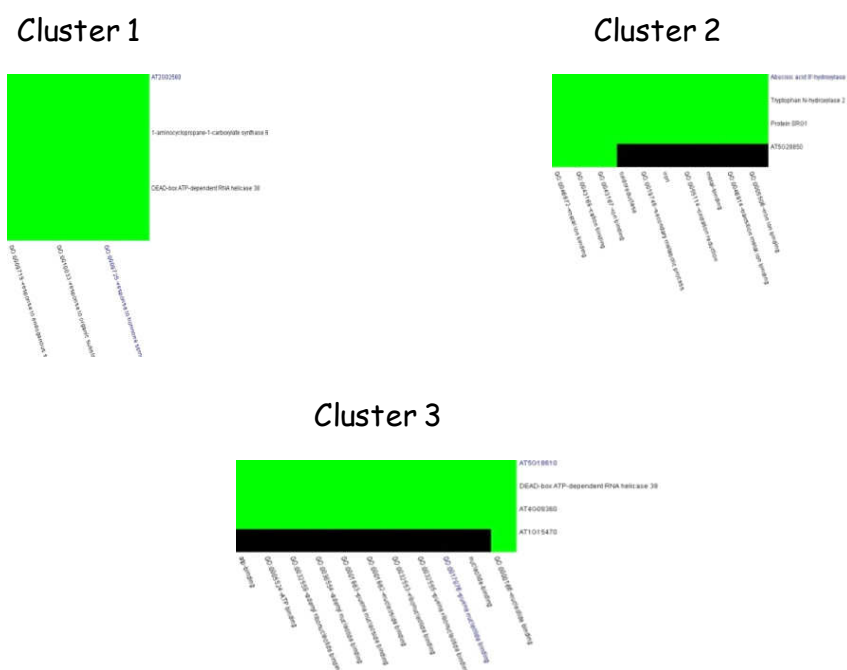


Fig. 15. Analisi cluster funzionali nel confronto Monalbo inoculato e Monalbo non inoculato

Nel cluster 1 “risposta a stress” i geni maggiormente rappresentativi sono: l’ACS6 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase 6), gene che viene espresso principalmente nelle radici e nei fiori che ha un ruolo essenziale nella sintesi dell’etilene e il gene LOS4 (low expression of osmotically responsive genes) che è espresso quando le piante sono sottoposte a stress. Nel secondo cluster che interessa i processi metabolici secondari si evidenziano, invece, i seguenti geni: il CYP707A1 coinvolto nella degradazione ossidativa dell’acido abscissico ; esso è espresso nelle radici, nei fiori, il gene SRG1 espresso nelle radici e nelle foglie è indotto durante senescenza o infezione biotica. L’ultimo cluster comprende, invece, geni con funzione ancora non nota; si menziona il gene LOS4 presente già nel cluster 1 che è espresso quando le piante sono sottoposte a stress (tab. 12).

Tab. 12. Analisi cluster funzionale “David” del confronto tra Monalbo inoculato e Monalbo non inoculato

<b>Cluster 1 Response to Stress</b>	<b>P-value</b>	<b>Benjamini</b>
response to hormone stimulus	9.9E-1	1.8E-1
response to endogenous stimulus	9.9E-1	2.0E-1
response to organic substance	1.0E0	2.7E-1
<b>Cluster2 Secondary metabolic process</b>		
secondary metabolic process	4.9E-2	9.5E-1
iron	9.5E-2	8.8E-1
iron ion binding	1.5E-1	1.0E0
oxidoreductase	1.8E-1	9.4E-1
oxidation reduction	2.7E-1	1.0E0
metal-binding	5.0E-1	9.8E-1
metal ion binding	6.5E-1	1.0E0
cation binding	6.9E-1	1.0E0
ion binding	6.9E-1	1.0E0
transition metal ion binding	7.7E-1	1.0E0
<b>Cluster3 Nucleotide Binding</b>		
atp-binding	4.2E-1	9.9E-1
nucleotide-binding	4.8E-1	9.9E-1
nucleotide binding	6.4E-1	1.0E0
ATP binding	6.7E-1	1.0E0
adenyl ribonucleotide binding	6.8E-1	1.0E0
adenyl nucleotide binding	7.2E-1	1.0E0
purine nucleoside binding	7.2E-1	1.0E0
nucleoside binding	7.2E-1	1.0E0
ribonucleotide binding	7.4E-1	1.0E0
purine ribonucleotide binding	7.4E-1	1.0E0
purine nucleotide binding	7.7E-1	1.0E0

Nel confronto tra le due tesi inoculate i geni differenzialmente espressi sono condotti principalmente nei processi di biosintesi.

In questo cluster rispetto a quelli precedenti sono conosciute tutte le annotazioni funzionali dei geni (fig. 16).



### Cluster 1

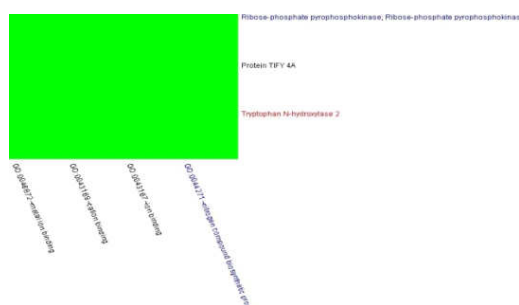


Fig. 16. Analisi cluster funzionali nel confronto Momor inoculato e Monalbo inoculato

Nel cluster sono coinvolti principalmente il gene PPD1 (plant-specific putative dna-binding protein 1) responsabile della crescita dei tessuti, il gene Ribose-phosphate pyrophosphokinase con funzione catalitica e il gene CYP79B3 (Tryptophan N-hydroxylase 2) appartenente alla famiglia dei citocromi P450 e che ha un ruolo come catalizzatore del triptofano (tab. 13).

Tab. 13. Analisi cluster funzionale “David” del confronto tra Momor inoculato e Monalbo inoculato

Cluster Biosynthetic Process	P-value	Benjamini
nitrogen compound biosynthetic process	4.0E-2	9.2E-1
metal ion binding	7.1E-1	1.0E0
cation binding	7.3E-1	1.0E0
ion binding	7.4E-1	1.0E0

### 4.2.3 Annotazione funzionale e ricostruzione dei cicli biosintetici

Per visualizzare la funzione metabolica dei geni differenzialmente espressi nell’esperimento microarray è stato utilizzato il software MAPMAN

Con questo software è stata prodotta un'immagine che rappresenta il metabolismo cellulare ottenendo una panoramica veloce della regolazione delle vie metaboliche.

Da questa analisi è stato visualizzato graficamente il metabolismo cellulare dei tre esperimenti microarray in cui gli istogrammi in rosso rappresentano i geni sovraespressi mentre quelli in blu rappresentano i geni sottoespressi per ogni ciclo metabolico (Fig. 17).

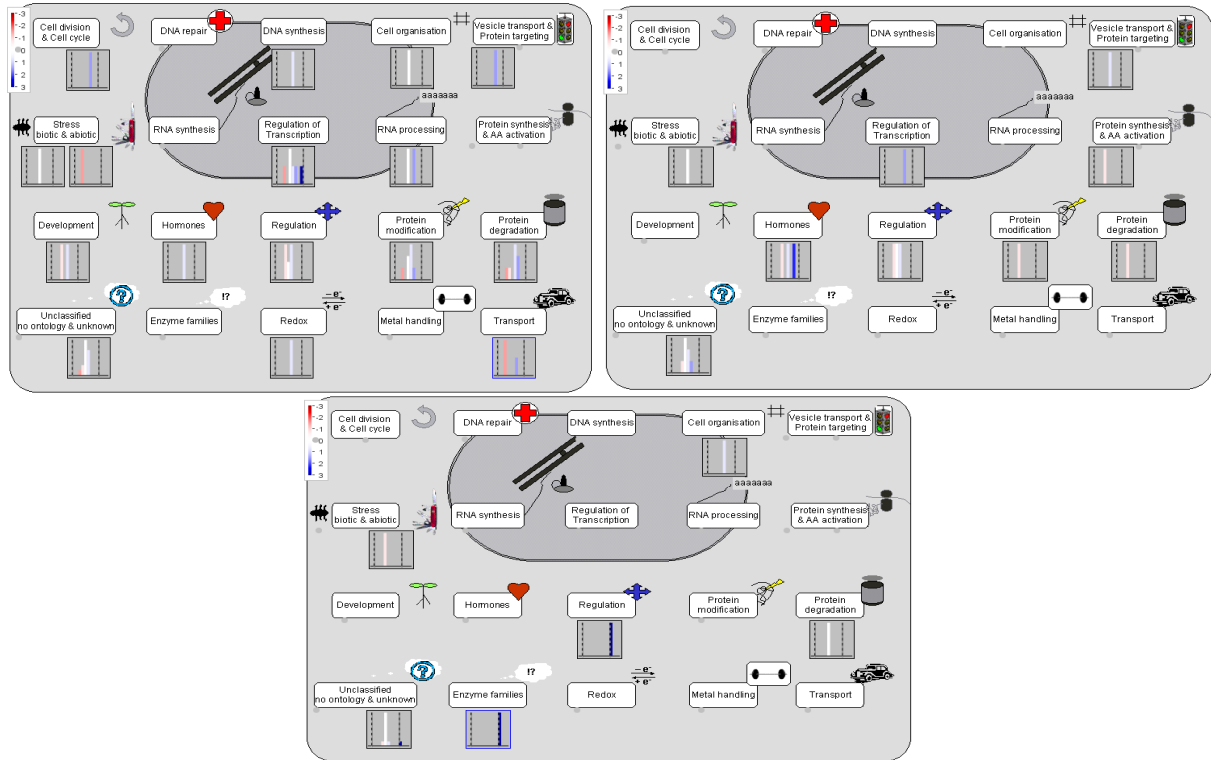


Fig. 17. Rappresentazione grafica del metabolismo cellulare dei tre esperimenti microarray

Come si evidenzia numerosi sono i geni coinvolti nel processo di cui non è ancora reperibile una categoria funzionale. La categoria degli “unknown”, infatti, per tutti le tesi rappresentano una percentuale consistente sul totale.

Nel confronto tra genotipo resistente inoculato e il genotipo resistente non inoculato, le categorie maggiormente rappresentate sono la categoria funzionale della Degradazione delle proteine (13%), della “Protein Postranslation” (13%) e della Regolazione dell’RNA (11%). Nella categoria funzionale “Degradazione delle proteine” si evidenziano i trascritti che presentano omologia con “l’Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase”, “la Leucine-rich repeat family protein”, “il Zinc finger family protein” e “il F-box family protein” mentre nella classe funzionale delle “Protein postranslational modification” si evidenziano principalmente la Protein kinase, Protein phosphatase 2C e Casein kinase II.

Nel confronto tra il genotipo suscettibile inoculato e lo stesso non sottoposto ad inoculazione, invece, il metabolismo ormonale (16%) e il “signalling” sono le categorie che rivestono un ruolo chiave. Nella prima categoria sono coinvolti principalmente trascritti che presentano similarità con “l’Aminocyclopropane-1-carboxylate acid synthase 2”, “il 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenase” e “l’Ethylene response factor” mentre nella seconda categoria si evidenziano principalmente la “Lectin protein kinase family protein”, il “Calmodulin-binding protein” e il “GTP-binding protein”. Nel confronto tra le due tesi inoculate, invece, possiamo evidenziare la categoria degli Enzimi che non si rileva nei confronti precedenti e che potrebbe avere un ruolo inerente nel processo di resistenza. Possiamo mettere in evidenza in questa classe funzionale il glutathione-S-transferasi. Si riporta nella tabella 14 la percentuale dei geni differenzialmente espressi nei tre esperimenti microarray.

Tab. 14. Percentuale dei geni differenzialmente espressi nei tre confronti

GO process	Geni differenzialmente espressi (%)		
	Momor I vs Momor NI	Monalbo I vs Monalbo NI	Momor I vs Monalbo I
Stress abiotic	2	5	7
cell.cycle	2		
cell. vesicle transport	2	5	
<b>not assigned.unknown</b>	28	37	69
<b>hormone metabolism</b>	2	<b>16</b>	
<b>protein.degradation</b>	<b>13</b>	5	6
redox.regulation	2		
development	4		
stress.biotic	2		
RNA.processing	4		
<b>signalling</b>	9	<b>16</b>	6
<b>RNA.regulation of transcription</b>	<b>11</b>	5	
cell.organisation	2		6
DNA.synthesis/chromatin structure	2		
<b>protein.postranslational modification</b>	<b>13</b>	5	
protein.synthesis		6	
<b>enzimi</b>			<b>6</b>

Si è proceduti, successivamente, nell’applicare “l’Over-representation analysis (ORA)” delle sequenze differenzialmente espresse grazie all’uso del programma GeneTrail. Per questa analisi sono state convertite le sequenze dei differenzialmente espressi con omologhi delle ID Reference di Arabidopsis e che sono state sovrapposte, poi, nelle mappe di co-regolazione contenute nel programma.

Nel confronto tra Momor inoculato e Momor non inoculato le categorie più rappresentative sono: “protein serine/threonine kinase activity”, risposta a stimoli esterni, attività della chinasi, attività dell'idrolasi e “hydrolyzing O-glycosyl compounds” (Tab. 15).

I geni coinvolti in questa interazione principalmente sono : ATN11(proteina serina/treonina), CPK6 (proteina chinasi calcio dipendente 6), SAG21 (senescence-associated gene 21) , BGLU33 (beta glucosidase 33), CESA2 (Cellulosa sintasi) e SUS6 (saccarosio sintasi 6).

Tab. 15. Analisi funzionale “GeneTrail” fra Momor inoculato e Momor non inoculato		
<b>Momor Inoculato vs Momor Non inoculato</b>		
<b>Subcategory name</b>	<b>p-value</b>	<b>Gene IDs of test set in subcategory</b>
photoperiodism, flowering	0.00322507	ATAN11 CPR5
transmembrane transport	0.00331038	AT5G10420 CPK6 AT5G26250
photoperiodism	0.00368267	ATAN11 CPR5
<b>protein serine/threonine kinase activity</b>	0.010118	AT5G48640 AT5G21170 AT5G56890 ATN1 CPK6
<b>response to external stimulus</b>	0.0118984	ATAN11 AT5G21170 SAG21
vegetative to reproductive phase transition of meristem	0.0146496	ATAN11 CPR5
cell communication	0.0188741	AT5G21170 SAG21 AT4G35380
reproductive structure development	0.0207466	ACAT2 ATAN11 KAN AT5G10420 CPR5
<b>glucosyltransferase activity</b>	0.0284219	CESA2 SUS6
<b>protein kinase activity</b>	0.0287609	AT5G48640 AT5G21170 AT5G56890 ATN1 CPK6
cellular response to extracellular stimulus	0.0288137	AT5G21170 SAG21
cellular response to external stimulus	0.0288137	AT5G21170 SAG21
reproductive developmental process	0.0328206	ACAT2 ATAN11 KAN AT5G10420 CPR5
response to extracellular stimulus	0.0341015	AT5G21170 SAG21
cellular response to chemical stimulus	0.0454819	CPR5 SAG21 CPK6 ACAT2 ATAN11 KAN AT5G10420
reproductive process	0.0457806	CPR5
<b>hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds</b>	0.0463101	AT5G13690 AtGH9C2 BGLU33
organ morphogenesis	0.0475948	KAN CPR5 ACAT2 ATAN11 KAN AT5G10420
reproduction	0.0491013	CPR5

Nel confronto tra Monalbo inoculato e Monalbo non inoculato secondo la Gene Ontology le classi più rappresentative sono: Risposta a Stress, “Biding”, Risposta a stimoli, Risposta di difesa, Attività catalitica e Risposta a stimoli ormonali. I geni coinvolti nella categoria funzionale di risposta allo stress biotici sono coinvolti geni come LOS (low expression of osmotically responsive genes), ACS6 (aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase), CYP707A1 (abscisic acid 8'-hydroxylase/oxygen binding). In Biding rilevano nPAP (nucleotidyltransferase/protein), ATCYSB (cysteine protease inhibitor), PMDH1 (malato deidrogenasi), JAC1 (heat shock protein binding). Sono coinvolti in Risposta a stimoli il gene LOS4 (low expression of osmotically responsive genes), il gene ATCYSB (inibitore delle cisteina proteasi), il gene ACS6 (1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase), il gene CYP707A1 (abscisic acid 8'-hydroxylase/oxygen binding) e il gene CAND1 (cullin-associated and neddylation dissociated) (Tab. 16).

Tab. 16. Analisi funzionale “GeneTrail” fra Monalbo inoculato e Monalbo non inoculato		
Monalbo Inoculato vs Monalbo Non inoculato		
Subcategory name	p-value	Gene IDs of test set in subcategory
organic acid catabolic process	0.00284371	PMDH1
carboxylic acid catabolic process	0.00284371	PMDH1
cellular amino acid derivative metabolic process	0.00301008	ACS6 SRG1
monocarboxylic acid metabolic process	0.00507711	PMDH1 CYP707A1
carboxylic acid metabolic process	0.00539417	ACS6 PMDH1 CYP707A1
oxoacid metabolic process	0.00539417	ACS6 PMDH1 CYP707A1
organic acid metabolic process	0.00542101	ACS6 PMDH1 CYP707A1
cellular ketone metabolic process	0.00577808	ACS6 PMDH1 CYP707A1
secondary metabolic process	0.00711469	CYP707A1 SRG1
apoptosis	0.00898562	ACS6 AT4G09360
response to wounding	0.0102461	ACS6
oxidoreductase activity	0.0128435	CYP707A1 SRG1
cellular localization	0.013773	LOS4 JAC1
sulfur metabolic process	0.0143143	ACS6
small molecule metabolic process	0.0147211	ACS6 PMDH1 CYP707A1 SRG1
<b>response to stress</b>	0.0162947	LOS4 ACS6 CYP707A1 AT4G09360 AT1G13340 nPAP ATCYSB AT5G57150 ACS6 AT5G18610 PMDH1 JAC1
<b>binding</b>	0.0169418	AT5G07910 AT2G18890 AT5G28850 CYP707A1 AT1G15470 AT4G09360 AT5G44330 CAND1
cellular amino acid derivative biosynthetic process	0.0186289	ACS6 SRG1
programmed cell death	0.0187981	ACS6 AT4G09360
cellular amino acid and derivative metabolic process	0.0191378	ACS6 SRG1
aromatic compound biosynthetic process	0.0200006	SRG1
cellular catabolic process	0.0208696	PMDH1 VFB2
small molecule catabolic process	0.021954	PMDH1
oxygen binding	0.0228673	CYP707A1

<b>response to stimulus</b>	0.0228956	LOS4 ATCYSB ACS6 CYP707A1 AT4G09360 AT1G13340 CAND1
cell death	0.0255069	ACS6 AT4G09360
death	0.0255069	ACS6 AT4G09360
response to auxin stimulus	0.0343405	ACS6 CAND1
small molecule biosynthetic process	0.0353584	ACS6 SRG1
monooxygenase activity	0.0356562	CYP707A1
response to abiotic stimulus	0.0361958	LOS4 ATCYSB ACS6 CYP707A1
catabolic process	0.038934	PMDH1 VFB2
<b>defense response</b>	0.0406555	CYP707A1 AT4G09360 AT5G13690 LOS4 CYP79B3 nPAP
catalytic activity	0.0408619	ACS6 AT5G18610 PMDH1 AT2G18890 AtCXE5 CYP707A1 SRG1 VFB2 AT4G09360
cellular amino acid metabolic process	0.0441909	ACS6
<b>response to hormone stimulus</b>	0.0482185	LOS4 ACS6 CAND1
cellular aromatic compound metabolic process	0.0493418	SRG1

Nel confronto tra le due tesi inoculate possiamo evidenziare che i geni sovraespressi sono principalmente quelli coinvolti nei processi metabolici inerenti al processo metabolico del nitrogeno, ai processi catabolici e al metabolismo secondario. I geni interessati in queste categorie sono principalmente la glutatione transferasi (ATGSTU23-8) e il CYP79B3 (appartenete alla famiglia dei citocromo P450), nPAP (nucleotidiltransferasi) e HD2B (histone deacetylase ) (Tab. 17).

Tab. 17. Analisi funzionale “GeneTrail” fra Momor inoculato e Monalbo inoculato

<b>Momor Inoculato vs Monalbo Inoculato</b>		
<b>Subcategory name</b>	<b>p-value</b>	<b>Gene IDs of test set in subcategory</b>
toxin metabolic process	0.000614984	ATGSTU23 ATGSTU8
toxin catabolic process	0.000614984	ATGSTU23 ATGSTU8
glutathione transferase activity	0.000669596	ATGSTU23 ATGSTU8
<b>secondary metabolic process</b>	0.0035608	CYP79B3 ATGSTU23 ATGSTU8
transferase activity, transferring alkyl or aryl (other than methyl) groups	0.00429573	ATGSTU23 ATGSTU8
<b>cellular catabolic process</b>	0.0107698	CYP79B3 ATGSTU23 ATGSTU8
<b>catabolic process</b>	0.0206055	CYP79B3 ATGSTU23 ATGSTU8
<b>cellular nitrogen compound metabolic process</b>	0.0360598	CYP79B3 nPAP AT5G57150
<b>nitrogen compound metabolic process</b>	0.0398491	AtTLP1 AT2G44530 HD2B
cellular nitrogen compound biosynthetic process	0.0448296	CYP79B3 AT2G44530

Successivamente alla Over-representation analysis è stato possibile visualizzare i cicli metabolici che si sono attivati durante il processo di resistenza pianta-patogeno. Nel confronto Momor inoculato e Momor non inoculato, infatti, sono stati individuati sei cicli metabolici potenzialmente coinvolti secondo l’annotazione della Kegg (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) mentre nel confronto Momor inoculato e Monalbo inoculato è stato individuato il ciclo metabolico della biosintesi del glucosinolato.(Tab. 18).

Tab. 18. Pathway individuate nei confronti Momor inoculato e non e nel confronto Momor inoculato e Monalbo inoculato

<b>Pathway confronto Momor inoculato vs Momor non inoculato</b>		
<b>subcategory name</b>	<b>p-value</b>	<b>expected number of genes</b>
Lysine degradation	0.00041444	0.0328467
Propanoate metabolism	0.000746286	0.0437956
Fatty acid metabolism	0.00204769	0.0722628
Valine, leucine and isoleucine degradation	0.00230301	0.0766423
<b>Tryptophan metabolism</b>	0.0024361	0.0788321
Pyruvate metabolism	0.00781729	0.142336
<b>Pathway confronto Momor inoculato VS Monalbo inoculato</b>		
<b>subcategory name</b>	<b>p-value</b>	<b>expected number of genes</b>
Glucosinolate biosynthesis	0.0274649	0.0277372

Dall'analisi dei cicli metabolici è interessante evidenziare come il metabolismo triptofano sia collegato alla biosintesi del glucosinolato. Nel metabolismo del glucosinolato la famiglia dei citocromi P450 sintetizza attraverso il ciclo del triptofano i precursori dei composti del glucosinolato (Fig. 18). Essendo questi prodotti del glucosinolato noti per essere attivati durante il processo di difesa all'attacco biotico si ipotizza che due cicli abbiano un ruolo principale in questa interazione pomodoro-Forl.





### 4.3 Libreria sottrattiva

Sono state costruite due librerie di cDNA utilizzando la tecnica dell'SSH. Il confronto è stato eseguito tra il genotipo resistente e genotipo suscettibile inoculati a 15 DPI. Questa tecnica è stata condotta per integrare l'analisi trascrizionale effettuata mediante l'esperimento microarray e per arricchire l'informazione sui trascritti differenzialmente espressi e rari della collezione precedentemente ottenuta. È stata analizzata la libreria forward, contenente i trascritti dei geni modulati positivamente dal processo di resistenza dei genotipi inoculati.

Sono stati ottenuti 250 cloni di cui 100 sono stati analizzati. Da 100 colonie di partenza 80 hanno presentato l'inserito e dopo l'estrazione del DNA plasmidico di queste colonie si è proceduto al loro sequenziamento.

Tutte le sequenze selezionate sono state confrontate con database dell'NCBI e del TIGR al fine di ottenere un'annotazione più precisa (Tab.19).

<b>Tab. 19. Annotazione funzionale SSH</b>		
<b>Annotazione</b>	<b>ID</b>	
	<b>NCBI</b>	<b>TIGR</b>
S.lycopersicum DNA sequence from clone LE_HBa-8K13 on chromosome 4, complete sequence	CU457448.6	TC217182
Lycopersicon esculentum phospholipase PLDb1 (PLDb1) mRNA, complete cds	A Y013255.1	TC218059
Lycopersicon pimpinellifolium serine/threonine protein kinase Pto (Pto) gene, Rb'1, Ra, and Rb'2 pseudogenes, complete cds	U59315.1	TC217450
Arabidopsis lyrata clone Gypsy20 transposon-insertion display band genomic sequence	EU558521.1	TC239878
Solanum lycopersicum cDNA, clone: LEFL2004N23, HTC	AK325648.1	TC225602
Solanum lycopersicum strain Heinz 1706 chromosome 1 clone hba-126f9 map 1, complete sequence	AC238908.8	TC224392
Lycopersicon esculentum beta-1,3-glucanase mRNA, complete cds	M80608.1	TC218035
Lycopersicon esculentum clone 135387R, mRNA sequence	BT013367.1	TC223430
Solanum lycopersicum chromosome 11 clone C11HBa0054I23, complete sequence	AC212431.2	TC241004
Solanum lycopersicum cDNA, clone: LEFL1096AG07, HTC in leaf	AK325404.1	TC235039
Arabidopsis lyrata clone CACTA2 transposon-insertion display band genomic sequence	EU558528.1	TC226686
Lycopersicon esculentum clone 134975R, mRNA sequence	BT013307.1	TC243398
Solanum lycopersicum chromosome 3 clone C03SLm0100M07, complete sequence	AC238477.1	TC217898
Mycobacterium sp. HXN-1500 operon (ahpGHI genes	AJ783967.1	TC239878
Beta nana Ty1-copia-like retrotransposon partial pol pseudogene, clone Tbn-6	AJ489197.1	TC236160
Solanum lycopersicum cDNA, clone: LEFL1056CB06, HTC in leaf	AK323427.1	TC217990
Lycopersicon esculentum clone 113856R, mRNA sequence	BT012812.1	TC225999
Solanum lycopersicum cDNA, clone: FC05BA02, HTC in fruit	AK246256.1	TC217868
Lycopersicon esculentum clone 113817F, mRNA sequence	BT012801.1	TC217990
Solanum lycopersicum cDNA, clone: LEFL1020DA05, HTC in leaf	AK321157.1	TC22128
Beta nana Ty1-copia-like retrotransposon partial pol pseudogene, clone Tbn-6	AJ489197.1	TC232488
Phytophthora cinnamomi tub1 gene for alpha-tubulin, strain Pr120	AM412177.1	TC240044
Solanum lycopersicum cDNA, clone: LEFL1002CE12, HTC in leaf	AK319838.1	TC219329

### 4.3.1 Analisi funzionale e ricostruzione dei cicli biosintetici

L'analisi di cluster funzionali è stata effettuata con il programma “David Bioinformatic Resources” sviluppato dal NAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases).

Nel confronto tra il genotipo resistente inoculato e genotipo suscettibile inoculato sono stati evidenziati tre cluster (Fig. 19) in cui le aree colorate in verde rappresentano i geni ai quali sono note le annotazioni funzionali mentre le aree colorate in nero rappresentano i geni ai quali non è ancora riportata la categoria funzionale di appartenenza.

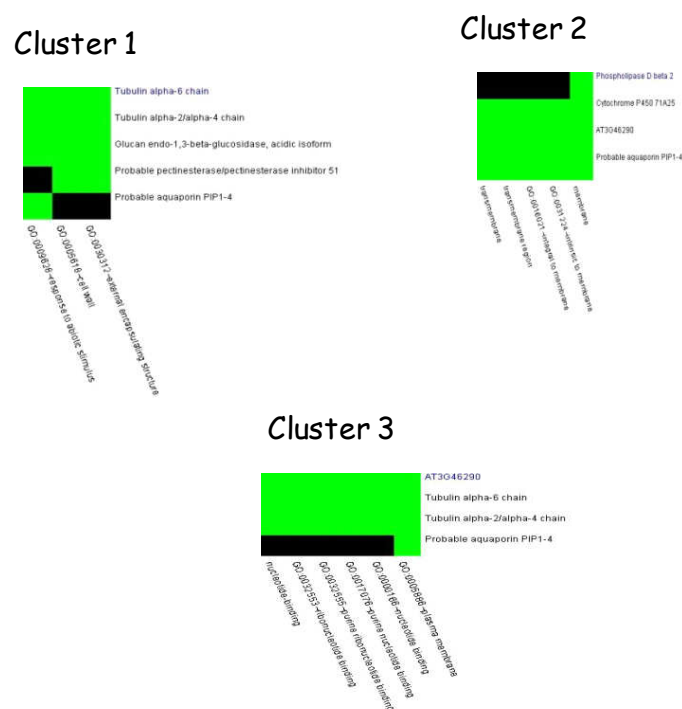


Fig. 19. Analisi cluster funzionali nel confronto Momor inoculato e Monalbo inoculato

Nel cluster 1 si evidenziano geni come la BGL2 (Glucan endo-1,3-beta-glucosidase) che svolge un ruolo fondamentale di difesa contro l'infezione da patogeni; il gene PIP1;4 (plasma membrane intrinsic protein) altamente espresso nelle radici è coinvolto nel trasporto di acqua e di piccoli soluti alle cellule di membrana, il gene AT5G09760 (pectinesterase inhibitor 51) che agisce sulla degradazione della pectina; i geni TUA2 (Tubulin alpha-2/alpha-4 chain) e TUA6 (Tubulin alpha-6 chain) che sono i maggior costituenti dei microtuboli.

Nel cluster 2 si rilevano il gene CYP71A25 (citocromo P450) che ha funzione catalitica; il gene PLDBETA2 (fosfolipasi D) che svolge un ruolo durante l'idrolisi del glicerolo e dei fosfolipidi; e il gene PIP1;4.

Nel cluster 3 si evidenzia il gene HERK1 (Hercules) che svolge un ruolo principale come ricettore della chinasi (Tab. 20).

Tab. 20. Analisi funzionale "Davidl" fra Momor inoculato e Monalbo inoculato		
<b>Cluster 1</b>	<b>P-Value</b>	<b>Benjamini</b>
cell wall	6.0E-3	1.4E-1
external encapsulating structure	6.2E-3	7.5E-2
response to abiotic stimulus	2.5E-2	7.9E-1
cell wall	6.0E-3	1.4E-1
<b>Cluster 2</b>		
membrane	5.1E-2	8.9E-1
transmembrane	1.7E-1	7.8E-1
transmembrane region	4.0E-1	1.0E0
integral to membrane	4.3E-1	9.4E-1
intrinsic to membrane	5.4E-1	9.6E-1
<b>Cluster 3</b>		
nucleotide-binding	1.6E-1	8.4E-1
plasma membrane	1.7E-1	7.8E-1
ribonucleotide binding	4.9E-1	1.0E0
purine ribonucleotide binding	4.9E-1	1.0E0
purine nucleotide binding	5.3E-1	1.0E0
nucleotide binding	6.4E-1	1.0E0

Si è proceduti, successivamente nell'Over-representation analysis (ORA) delle sequenze grazie all'uso del programma GeneTrail. Per l'analisi sono state convertite le sequenze ottenute dalla libreria con omologhi delle ID Reference di *Arabidopsis* (Tab. 21). In questa analisi si sono considerate le categorie di Gene Ontology con p-value  $\leq 0,05$ .

Tab. 21. Analisi funzionale “GeneTrail” fra Momor inoculato e Monalbo inoculato

<b>Momor Inoculato vs Monalbo Inoculato</b>		
<b>subcategory name</b>	<b>p-value</b>	<b>GeneIDs of test set in subcategory</b>
tubulin complex	0.00143681	TUA6 TUA2
structural constituent of		
cytoskeleton	0.00284419	TUA6 TUA2
cell wall	0.00284419	BGL2 AT5G09760 TUA6 TUA2
vacuole	0.00284419	BGL2 AT5G60390 COPT5 TUA6
external encapsulating structure	0.00284419	BGL2 AT5G09760 TUA6 TUA2
microtubule-based process	0.0161376	TUA6 TUA2
metal ion transmembrane	0.0161376	COPT5 KEA3
		PIP1;4 AT3G46290 AT5G60390
plasma membrane	0.0257446	COPT5 TUA6
response to abiotic stimulus	0.0257446	PIP1;4 BGL2 TUA6 TUA2
cytoskeletal part	0.0257446	TUA6 TUA2
cytoskeleton	0.0258784	TUA6 TUA2
inorganic cation transmembrane		
transporter activity	0.0273948	COPT5 KEA3
metal ion transport	0.0273948	COPT5 KEA3
		BGL2 AT5G60390 AT1G49890
		AT5G09760 COPT5 TUA6 KEA3
cytoplasmic part	0.0273948	TUA2
		PIP1;4 PLDBETA2 AT3G46290
membrane	0.0277152	AT5G60390 COPT5 TUA6 TUA2
substrate-specific		
transmembrane transporter		
activity	0.0282403	PIP1;4 COPT5 KEA3
		BGL2 AT5G60390 AT1G49890
		AT5G09760 COPT5 TUA6 KEA3
cytoplasm	0.0365467	TUA2
substrate-specific transporter		
activity	0.0387424	PIP1;4 COPT5 KEA3
cation transport	0.0426174	COPT5 KEA3
transmembrane transporter		
activity	0.0426174	PIP1;4 COPT5 KEA3
apoplast	0.0426174	BGL2 AT1G78820

La categoria di geni omologhi coinvolti in questa interazione sono: PLDBETA2 (fosfolipasi D), PIP1-4 (water channel), BGL2 (glucan 1,3-beta-glucosidase), KEA3 (potassium ion transmembrane transporter), TUA6 (structural constituent of cytoskeleton ) e COPT5 (copper ion transmembrane transporter).

Il gene PIP1-4 è coinvolto in più processi cellulari, infatti, è implicato secondo l'annotazione Gene Ontologie nelle sub categorie: “plasma membrane”, “transmembrane transporter activity”, “substrate-specific transporter activity”, “substrate-specific transmembrane transporter activity”, “membrane”, “plasma membrane”, “response to abiotic stimulus”.

Il gene BGL2, invece, si riscontra nelle subcategorie: “apoplast”, “cytoplasm”, “cytoplasmic part”, “response to abiotic stimulus”, “cell wall”, “vacuole” e “external encapsulating structure”,

Il gene TUA6 è coinvolto nella sub categoria: “cytoplasm”, “membrane”, “cytoplasmic part”, “cytoskeleton”, “cytoskeletal part”, “microtubule-based process”, “external encapsulating structure”, “cell wall”, “vacuole”, “structural constituent of cytoskeleton” e “tubulin complex”.

Il gene KEA3 è coinvolto nei seguenti processi cellulari: “cation transport”, “substrate-specific transporter activity”, “substrate-specific transporter activity”, “cytoplasm”, “substrate-specific transmembrane transporter activity”, “metal ion transport”, “inorganic cation transmembrane transporter activity” e “metal ion transmembrane transporter activity”

La PLDBETA2, invece è coinvolto nella categoria funzionale “membrane”

Un altro approccio di analisi poter riunire le sequenze differenzialmente espresse è stato l'utilizzo del programma MAPMAN.

Con questa analisi il 27% delle sequenze analizzate risulta essere rappresentata da geni che rientrano nella categoria funzionale degli enzimi, il 13% ha mostrato avere omologia con geni coinvolti nel trasporto cellulare, il 7% fanno parte del Ciclo cellulare, il 13% sono coinvolti nell'organizzazione cellulare, il 7% presentano similarità con geni nella regolazione della segnalazione, il 7 % mostra omologia con geni che codificano per la degradazione delle proteine, il 7% è coinvolto nella sintesi delle proteine, il 6% è coinvolto negli stress abiotici e il 13% rappresentano sequenze a funzione sconosciuta (Fig. 20)

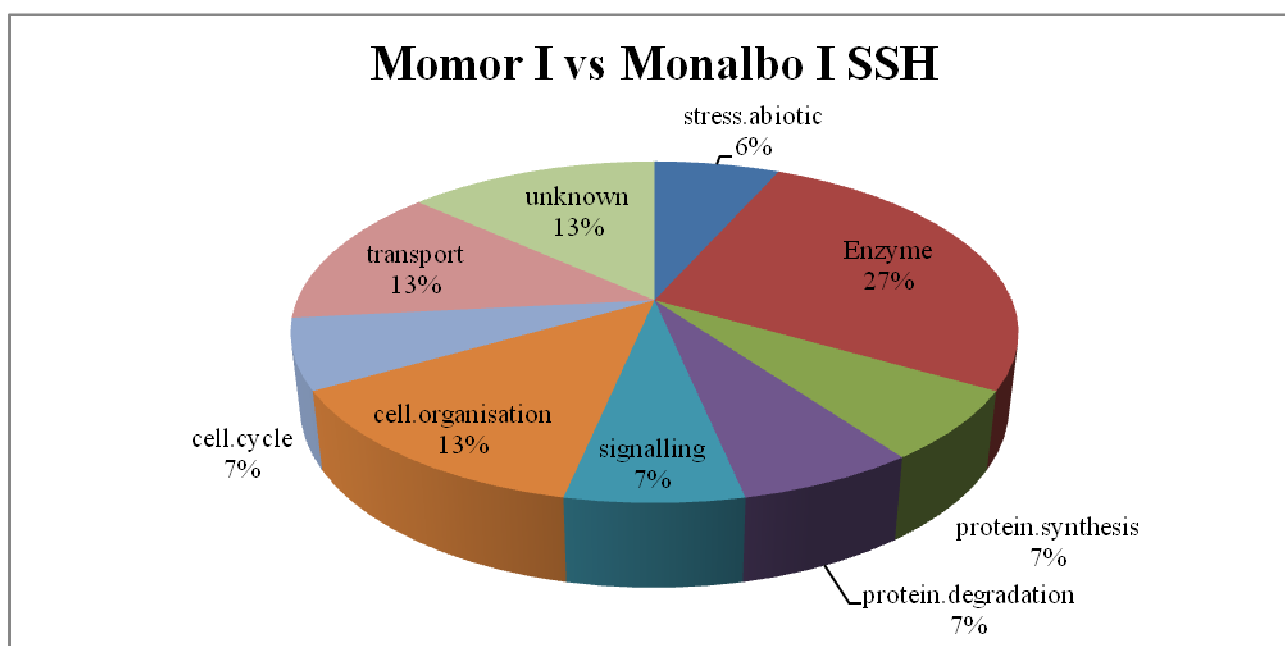


Fig. 20. Rappresentazione grafica del metabolismo cellulare nel confronto Momor inoculato e Monalbo inoculato

La percentuale riportata per ognuna delle categorie funzionali rappresenta il numero dei cloni che hanno mostrato similarità con le sequenze geniche depositate in banca dati la cui funzione è riportata dalla categoria stessa.

Nella categoria funzionale degli enzimi svolgono un ruolo principale i geni della  $\beta$ -1,3 glucanasi, del glicosiltransferasi, della ferrodossina e del citocromo P450. Nella categoria funzionale del trasporto cellulare si evidenziano i geni coinvolti nel trasporto di solfuri e proteine PIP mentre nella categoria funzionale della regolazione dei segnali i maggior rappresentanti sono le chinasi.

## 5. Discussione

Le piante sono continuamente esposte ad attacchi di origine biotica come funghi, virus, batteri. In risposta a questi stress biotici hanno sviluppato diversi meccanismi di risposta all'attacco parassitico che comprendono sistemi di difesa meccanica e sistemi di difesa biochimica. Durante l'interazione pianta-patogeno, inoltre, si attivano una serie di trascritti che regolano la risposta della pianta all'attacco microbico.

Nel nostro studio è stato valutato il processo d'interazione di resistenza/suscettibilità tra due linee isogeniche di pomodoro rispetto all'attacco del Forl.

Secondo I. Xu et al. (2006) il decorso della malattia provocata dal *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* varia dal tipo di ceppo utilizzato. Nel loro lavoro sono stati valutati tre ceppi differenti (a,b,c) di Forl. Nel primo ceppo i sintomi appaiono già dopo due giorni dall'inoculazione, infatti, si evidenzia una decolorazione brunastra che interessa le radici laterali d'emergenza e la zona basale della radice e che si espande rapidamente dopo 3-5 giorni dall'inoculazione nel cilindro centrale e nella regione del colletto. Negli altri due ceppi il decorso della malattia è più lungo e in particolare nel ceppo b dopo due giorni dell'inoculazione la decolorazione brunastra interessa la zona basale delle radici e l'area delle radici laterali d'emergenza per poi estendersi parzialmente dopo 5-6 nella zona del cilindro centrale. Solo dopo dieci giorni dall'inoculazione l'infezione interessa tutta l'area del cilindro e del colletto. Nel ceppo c il decorso della malattia è molto più lento, infatti, i sintomi appaiono solo dopo due giorni sulle radici laterali d'emergenza e solo dopo dieci giorni l'infezione interessa un'area marginale del cilindro centrale.

Altri studi dimostrano che dopo sei giorni dall'inoculazione l'infezione interessa il cilindro centrale e dopo dieci giorni il fungo riesce a colonizzare tutta la radice fino a portare alla morte della piantina (Anastasia. et al., 2001).

Dalla letteratura emerge, quindi, una grande variabilità del decorso della malattia in base al tipo di ceppo di Forl utilizzato. Nel nostro lavoro è stato opportuno, perciò, valutare il decorso della malattia provocata dal ceppo scelto per determinare il migliore momento di prelievo da utilizzare per le successive analisi. Nei nostri esperimenti dopo 7 giorni dall'inoculazione sono stati osservati sintomi visivi macroscopici. Pertanto si è ritenuto opportuno raccogliere i campioni per l'analisi trascrizionale dopo 15 giorni dall'inoculazione.

Inoltre mediante l'uso della tecnica Real Time Pcr è stato possibile analizzare l'andamento di espressione in tre tempi differenti d'inoculazione (0, 15, 21 giorni dall'inoculazione) delle due linee isogeniche utilizzate successivamente. Si è visto che nei tempi d'inoculazione scelti nella nostra



analisi vi sono differenze di espressione. In particolare per il gene Beta-glucanase nel genotipo resistente si evidenzia un cambio di espressione del gene quando si va a 0 DPI (sottoespresso) a 15 DPI (sovra espresso) mentre nel genotipo suscettibile l'espressione raddoppia a 15 DPI rispetto a 21 DPI. L'espressione, oltre a cambiare nell'arco temporale dell'inoculazione per singolo genotipo, differisce anche nel confronto fra i due linee e in particolare a 15 DPI nel il genotipo resistente si ha un'espressione di 0,6 mentre il genotipo suscettibile di 1,3 per poi avere una situazione opposta a 21 DPI.

Anche questi risultati hanno confermato che il tempo 15 DPI rappresenta il momento ottimale per valutare le differenze di espressione nella nostra interazione pomodoro-Forl.

Successivamente si è proceduti nell'analisi trascrizionale globale attraverso la tecnica microarray. Questa metodica ha dimostrato di essere molto utile per analizzare i trascritti di un intero genoma vegetale (Quirini and Bent 2003, van baarlen et al. 2008; Wise et al. 2007). Molti studi microarray sono stati effettuati in *Arabidopsis thaliana*, *N. tabacum*, *Z. mays* (Baldwin et al., 1999; Schenk et al., 2000; Scheideler et al., 2002; Chen et al., 2002). In particolare sono stati effettuati studi di interazione su *Arabidopsis thaliana* con il batterio *Pseudomonas syringae* (Maleck et al. 2000; Scheideler et al. 2002), con il fungo *Alternaria brassicicola* (Schenk et al., 2000; van Wees et al. 2003) e con l'*Hyaloperonospora parasitica* (Eulgem et al. 2004; Maleck et al. 2000). In pomodoro sono stati svolti numerosi lavori trascrizionali su *Verticillium dahliae*, *C. fulvum* (Robb et al. 2007; Van Esse et al. 2009), *Tomato Spotted Wilt Virus* (Catoni et al. 2009), *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Balaji et al. 2008), *Pseudomonas syringae* (Mysore et al. 2002). Tutti questi studi, oltre, a confermare l'espressione di geni noti, implicati nelle risposte di difesa, hanno anche portato alla scoperta di nuovi geni legati alla patogenesi, alle vie metaboliche o di trasduzione del segnale. Grazie agli esperimenti di microarray sono state delucidate vie di difesa patogeno-specifiche e non-patogeno-specifiche, sono stati approfonditi i meccanismi alla base della reazione ipersensitiva (HR), della resistenza sistemica acquisita (SAR).

Nel nostro studio attraverso la tecnica microarray si è cercato di analizzare e esplorare il cambiamento del profilo trascrizionale di un genotipo suscettibile e di un genotipo resistente a Forl. Per effettuare un'analisi globale dell'interazione pianta-Forl è stato opportuno effettuare quattro esperimenti microarray. Nel primo esperimento è stato confrontato il genotipo resistente inoculato e il genotipo resistente non inoculato, analizzando la tipologia di trascritti che sono attivati o repressi durante la risposta di resistenza. Il confronto tra il genotipo suscettibile sottoposto ad inoculazione con il genotipo suscettibile non sottoposto ad inoculazione è stato effettuato per poter evidenziare i geni che vengono attivati nel processo di suscettibilità mentre il confronto tra le due tesi inoculate è stato eseguito per poter rilevare le differenze trascrizionali durante il processo di

infezione tra il genotipo resistente Momor e il genotipo suscettibile Monalbo. È stato opportuno anche effettuare il confronto tra le due tesi non sottoposte ad inoculazione. In questo confronto è stato evidenziato un esiguo numero di trascritti fra i due genotipi. Questo risultato conferma che le due linee sono perfettamente isogeniche e che si evidenziano cambiamenti trascrizionali solo quando sono sottoposte a stress biotico. In questo confronto, perciò, non sono state effettuati altre tipi di analisi.

La tecnica microarray anche se è una metodologia molto utilizzata come approccio nel visualizzare l'andamento di un profilo trascrizionale, essendo basata su un processo di ibridazione, comporta alcune problematiche che se non valutate correttamente potrebbero compromettere il risultato reale dell'esperimento.

Il problema fondamentale dell'analisi di un risultato microarray è legato all'errore di lettura del dato. In quest'ambito delle scienze sperimentali la parola errore non ha la tradizionale connotazione di inesattezza o di sbaglio, ma è considerato errore ciò che incide sull'incertezza della misura che caratterizza i valori rilevati. Fonti di errore di varia natura possono presentarsi ad ogni passaggio di un esperimento di ibridazione anche se si procede con estrema cura durante i vari passaggi (Schuchhardt et al., 2000). Esistono due classi di errori definiti casuali e sistematici. Entrambi pregiudicando l'accuratezza dei risultati finali anche se influenzano in modo diverso gli esperimenti di ibridazione dei microarray. Metodi manuali e matematici vengono utilizzati per cercare di ridurli al minimo. Gli errori casuali possono verificarsi durante la preparazione delle molecole bersaglio e delle molecole sonda in modo tale da distribuire il valore di espressione misurato di un gene attorno al suo valore vero seguendo una distribuzione normale (Schuchhardt et al., 2000). È possibile ridurre questa categoria di errori tramite la ripetizione degli esperimenti in un numero sufficiente di volte. Gli errori di un esperimento d'ibridazione appartengono anche al gruppo degli errori sistematici. L'errore sistematico più importante che si compie nella preparazione di un esperimento di ibridazione con microarray si riscontra durante la marcatura del bersaglio. Per ridurre dunque questo genere di errore non serve ripetere l'esperimento più volte, ma bisogna invece applicare ai dati alcuni processi statistici di analisi definiti globalmente normalizzazione.

La normalizzazione, infatti, rappresenta un momento fondamentale per l'estrapolazione dei dati ed è, quindi, molto importante scegliere la metodologia più adatta al caso. Prima della normalizzazione bisogna eliminare la fluorescenza che deriva background al fine di ottenere un segnale netto. Questa fase è molto delicata in quanto a causa della sottrazione del background i geni con bassa espressione, il cui segnale di intensità è più debole del background, vengono eliminati dalle successive analisi.

Per la sottrazione del background possono essere utilizzati vari metodi. Alcuni si basano semplicemente sulla determinazione del livello di background globale del vetrino (Brown, et al., 2001). Altri producono una valutazione locale del livello di background su un intorno più o meno ampio dello spot che si sta considerando (Martinez et al., 2003). Altri ancora modellano il background con una distribuzione statistica (Kooperberg, et al., 2002; Silver. et al, 2009).

Successivamente l'altra fase estremamente importante è la normalizzazione. Questa può essere applicata ad ogni singolo vetrino o tra diversi vetrini. Nel primo caso vengono corretti gli errori sistematici su ogni array preso come unità a sè e indipendentemente dal disegno sperimentale, mentre nella normalizzazione tra vetrino permette di ottenere un dato confrontabile fra i vari array considerando sia il disegno sperimentale applicato a le repliche biologiche.

Nel nostro studio è stata scelta una normalizzazione applicata tra vetrini e in quanto gli esperimenti erano basati su diversi confronti delle tesi e dove per ogni ibridazione sussistevano repliche biologiche.

Esistono vari tipi di normalizzazione tra vetrini. La scelta nel nostro studio è stato l'utilizzo una normalizzazione quantile in quanto questa analisi ha mostrato la migliore bontà di adattamento ai nostri dati.

Successivamente mediante il t-test sono state ottenute le liste dei trascritti differenzialmente espressi per ogni esperimento. Per fornire una spiegazione biologica del fenomeno osservato. Sono state consultate diverse banche date che forniscono informazione di diversa natura. I data base consultati nel nostro studio sono stati principalmente quelli dell'NCBI, del TIGR e dell'Unigene attraverso i quali è stato possibile effettuare un' annotazione funzionale preliminare.

Per poter confermare i dati dell'esperimento microarray è stata condotta un'analisi d'espressione Real Time Pcr su dieci geni differenzialmente espressi nell'esperimento microarray. Tutti i geni sono stati scelti in base alle loro putative funzione biologiche e per la buona rappresentatività nel coinvolgimento agli stress biotici.

L'aldeide deidrogenasi (ALDH3H1) ed è stato scelto nell'analisi di espressione differenziale tra Momor inoculato e non. Le aldeidi deidrogenasi sono soprattutto coinvolte nella risposta agli stress (Guerrero et al., 1990; Stroehel al. 1995, Kirch et al. 2001; Chen et al. 2002; Ozturk et al. 2002; Seki et al. 2002); il gene ALDH3H1, in particolare, viene espresso principalmente in radice ed è coinvolto in molti cicli metabolici di risposta a stress, (zur Erlangung des Doktorgrades et al., 2004). Nel nostro studio questo gene è risultato differenzialmente espresso nel genotipo resistente inoculato rispetto al genotipo resistente non inoculato, infatti, nel genotipo resistente inoculato a 15 DPI il gene viene sovraespresso mentre quando il genotipo non è inoculato si verifica un comportamento opposto. Questo risultato è confermato anche in altri studi in cui la

sovraespressione di questo gene riduce il livello di reattività all'ossigeno comportando una tolleranza significativa agli stress (zur Erlangung des Doktorgrades et al., 2004).

Nel confronto del genotipo resistente inoculato con il genotipo resistente non inoculato molti trascritti differenzialmente espressi mostrano avere un'elevata omologia con geni appartenenti alla famiglia delle chinasi. Le proteine chinasiche sono coinvolte principalmente nei "pathway" di trasduzione. La clonazione della prima proteina chinastica risale nel 1989 (Lawton et al., 1989) e nei DNA-database (Benson et al, 1993) da allora sono state depositate centinaia di proteine chinasiche classificate in nuove famiglie. Il confronto del clone LEF2027J09 con quelle presente nelle banche dati ha mostrato una omologia con una chinasi identificata con *Arabidopsis thaliana*. Nella nostra analisi si evidenzia la chinasi nel genotipo resistente inoculato viene espressa in misura maggiore man mano che aumentano i giorni di inoculazione mentre nel genotipo resistente non inoculato l'espressione diminuisce all'aumentare dei giorni di inoculazione. Da questo risultato si deduce che questa chinasi viene attivata, quindi, quanto il genotipo è sottoposto a uno stress biotico, infatti, più aumentano i giorni di inoculazione e maggiormente viene espressa. L'andamento di espressione nel genotipo non trattato conferma che la chinasi viene attivata quando vi sono chiari segni dell'interazione pianta-patogeno, fornendo una caratterizzazione più completa della funzione di questa proteina.

Nel confronto tra il genotipo suscettibile inoculato e non è stata analizzata l'attività di una glicosiltransferasi che è risultata differenzialmente espressa. I composti del metabolismo secondario svolgono molteplici funzioni nelle piante come nella protezione a raggi UV lignificazione e resistenza alle malattie (Vet and Dicke, 1992; Li et al., 1993; Dixon, 2001; Anterola and Lewis, 2002). Questi composti raramente si accumulano liberi nei processi cellulari ma spesso sono coniugati agli zuccheri attraverso reazioni mediante la glicosiltransferasi (Vogt and Jones, 2000). Langlois-Meurinne e al. (2005) dimostrano come i geni relativi al metabolismo secondario della glicosiltransferasi sono espressi nell'interazione pianta-patogeno *Pseudomonas syringae* pv *tomato* in *Arabidopsis*. Questo dato conferma l'andamento nel nostro lavoro in quanto la glicosiltransferasi viene attivata principalmente quando il genotipo suscettibile è sottoposto ad inoculazione e la sua azione risulta essenziale in questo processo avendo un'espressione costante in tutti e tre tempi considerati. Nel genotipo non inoculato si denota la che l'attività della glicosiltransferasi è quasi assente mostrando una sottoespressione molto marginale a 15 DPI; ciò sottolinea che tale enzima è implicato solo durante i processi di infezione.

Analizzando l'espressione dell'Alfa-N-acetilglucosaminidasi nel nostro esperimento si evidenzia che nel genotipo suscettibile inoculato da Forl è espresso 0 DPI e che la sua espressione ha una live diminuzione a 7DPI per poi aumentare a 15DPI. Questo risultato conferma i risultati osservati da

Ferraris et al. (1987), che durante l'infezione con *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* notarono un aumento dell'Alfa-N-acetilglucosaminidasi, della chitinasi e della glicosidasi nei genotipi suscettibili e resistenti di pomodoro. L'aumento dell'attività di questi enzimi è stata rilevata maggiormente nei genotipi suscettibili in quanto il fungo continua a colonizzare i tessuti vascolari. Una delle principali risposte all'attacco dei patogeni e alle molecole elicitori è la generazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Lamb and Dixon, 1997) che comporta all'attivazione di geni relativi alla difesa come il glutathione-S-transferasi e PAL (Levine et al., 1994; Desikan et al., 1998; Grant et al., 2000). Nel nostro studio il genotipo resistente inoculato mostra un'espressione più del doppio rispetto al genotipo suscettibile, a 7 DPI il genotipo resistente raggiunge un valore molto elevato. Questo conferma che in entrambi i genotipi avviene una risposta ossidativa all'attacco del patogeno che comporta l'attivazione della glutathione-S-transferasi però l'espressione essendo maggiore nel genotipo resistente, conferma l'attivazione di geni relativi alla difesa. Diverse classi della famiglia GTS sono state identificate per avere un ruolo nei processi ossidativi e nella risposta a patogeni (Warren et al., 2001).

È stato interessante evidenziare, poi, tra i trascritti differenzialmente espressi l'espressione del retrotransposon-like. I retrotrasposoni sono una classe di elementi mobili che hanno un importante ruolo per l'evoluzione del genoma attraverso l'alterazione delle regioni codificanti e la regolazione di geni (Weil CF et al. 1990; Wessler SR et al. 1995). È stato analizzato che stress biotico e abiotico potrebbe far aumentare il livello di alcuni retrotrasposoni like come in tabacco e riso (Beguiristain et al. 2001; Pouteau et al. 1991, 1994; Takeda et al. 1998; Hirochika et al. 1996a, b). Iruela et al. (2009) nel loro studio sul *Ascochyta rabiei* in cece hanno identificato un marcatore associato alla resistenza al patogeno che presenta la sequenza di un retrotrasposone. Nella nostra analisi d'espressione si evidenzia che nel genotipo resistente è altamente espresso in tutti e tre i tempi mentre nel genotipo suscettibile esso mostra un'espressione poco rilevante. Questo conferma che i retrotrasposoni possono essere coinvolti nell'attivazione del processo di resistenza.

Per un'analisi dei risultati dell'esperimento microarray sono state svolte indagini conoscitive utilizzando diversi strumenti bioinformatici. A tale scopo sono stati confrontati i risultati prodotti da software che realizzano la cosiddetta "pathway analysis" cioè un'analisi mirata alla rivelazione di particolari "temi biologici" per i quali la lista dei geni differenzialmente espressi potrebbe suggerire la formulazione di ipotesi biologiche e giustificare la variazione di espressione genica osservata fra i campioni.

Una prima analisi è stata quella di organizzare i geni in gruppi con un simile pattern di espressione. Con questa prima analisi si è cercato di avere una visione globale di co-regolazione dei geni.

Per poter approfondire l'analisi cluster e per indagare sulla funzione biologica dei trascritti differenzialmente espressi si è utilizzato, poi, il programma DAVID. Con questo software è stato possibile raggruppare i geni secondo dei cluster funzionali. Da questa analisi è risultato evidente che nel confronto tra il genotipo resistente inoculato e il genotipo resistente non inoculato il cluster 6 che raggruppa le proteine chinasiche ha mostrato valori di arricchimento genico più alto.

Tra i geni coinvolti nel cluster risulta interessante l'attivazione del "proteina chinasi calcio dipendente". Diversi studi hanno dimostrato che le proteine chinasiche e fosfatichie assumono un ruolo chiave per risposte immediate di difesa (Yan et al., 1997; Scheel, 1998). Il processo di difesa delle piante viene attivato da una rete di segnali paralleli a pathway che possono essere collegati a singoli componenti. L'aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosolitico sembra essere un regolatore nelle fasi di segnalazione. Le attivazioni della chinasi, di geni di difesa e della produzione di fitoalessine sembra essere legato alla presenza di  $\text{Ca}^{2+}$  (Shell, 1998). In particolare i CPK appartengono alla classe delle serina/treonina-chinasi specifiche per le piante. La maggior parte di del "CPK gene family" hanno diverse funzioni nei pathway di segnalazione (Hong et al., 1996; Hrabak et al., 1996). Romeis et al (2000) dimostrano nel loro lavoro il possibile contributo dei CPK nella risposta di difesa durante l'interazione Cf-9/Avr9.

Si evidenzia, inoltre, che anche l' "adeide deidrogenasi" la cui attività è stata ampiamente descritta precedentemente insieme al gene HGO (2-Dioxygenase), il gene AHB2 (Non-symbiotic Haemoglobin 2) evidenziano una risposta all'attacco del patogeno attraverso l'attivazione di processi ossidativi.

Nel confronto tra il genotipo suscettibile inoculato e il genotipo suscettibile non inoculato possiamo rilevare che nel cluster 1 viene evidenziato una risposta ormonale durante il processo di suscettibilità. Il gene ACS6, infatti, svolge un ruolo fondamentale nelle sintesi dell'etilene. Numerosi studi hanno mostrato una correlazione tra l'aumento della produzione dell'etilene e la risposta alle infezione da patogeni, di sviluppo di sintomi clorotici e appassimento in molte specie (Goto et al., 1980; Pegg, 1981; Stall and Hall, 1984; Ben-David et al., 1986; Boller, 1991) compreso il pomodoro (Gentile and Matta, 1975; Pegg and Cronshaw, 1976a, 1976b; Elad, 1990). In tabacco è stato rilevato che in risposta dell'attacco del virus del mosaico (de Laat and Van Loon, 1983) e della *Phytophthora infestans* (Spanu and Boller, 1989) l'accumolo dell'etilene biosintetizzato dall' enzima "1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid" è stato localizzato nel tessuto clorotico circostanti alle lesioni primarie delle foglie.

L'attività di biosintesi dell'etilene localizzata vicino alle lesioni primarie suggerisce che la produzione dell'ormone potrebbe essere legato alla risposta delle cellule morte durante la formazione della lesione primaria. Recentemente, comunque, il ruolo dell'etilene durante

l'interazione pianta-patogeno è stato notevolmente dibattuto. In altri studi evidenziano che l'etilene potrebbe essere legato più al controllo del sintomo della malattia. La riduzione di etilene in mutanti di soia inoculati con *P. syringae* determina una riduzione dei sintomi cloritici mentre i mutanti quando sono inoculati con *Septoria glycines* e *Rhizoctonia solani* mostrano sintomi molto più gravi (Hoffman et al, 1999). Si deduce, quindi, che l'etilene può avere un effetto positivo o negativo sullo sviluppo dei sintomi della malattia in seguito al tipo d'interazione pianta-patogeno.

Nel confronto tra il genotipo resistente inoculato e il genotipo suscettibile inoculato, invece, è stato evidenziato il citocromo CYP79B3 appartenente alla famiglia dei citocromi P450. Le CYP79 sono sottofamiglie del citocromo P450 che sono usate come composti di difesa delle piante (Halkier and Du, 1997). L'importante ruolo del gene CYP79B3 è quello di essere un catalizzatore del pathway della biosintesi del triptofano. La sintesi del triptofano comporta la formazione di metabolismi secondari come i composti di difesa indol-3-acetic acid (IAA) e indole glucosinolate (Radwanski and Last, 1995). Nel lavoro Mikkelsen et al. (2003) dimostrano che trattando piante di *Arabidopsis thaliana* con methyljasmonate (ormone attivato nei processi di difesa) si ha l'induzione dei CYP79B3 con la produzione ai composti corrispondenti di glucosinolato.

Un altro approccio per indagare la funzione biologica dei trascritti differenzialmente espressi è stato l'utilizzo del programma GeneTrail. Con questo software è stato possibile confrontare i nostri dati con un data-set di riferimento effettuando quindi una "Over-Representation Analysis". Anche con questo tipo di approccio sono stati confermati i dati ottenuti con l'analisi con il programma DAVID. Nel confronto tra il genotipo resistente inoculato e il genotipo resistente non inoculato, infatti, le categorie più rappresentate sono quelle delle chinasi nel quale è coinvolto ad esempio il gene CPK6 già ampiamente descritto. Nel confronto tra il genotipo suscettibile inoculato e non le categorie più rappresentative sono la risposta a stimoli ormonali nel quale possiamo rilevare il gene ACS6 già evidenziato nella precedente analisi.

Nell'analisi tra il genotipo resistente inoculato e il genotipo suscettibile inoculato si evidenziano anche in questa analisi il gene CYP79B3 e l'attività della glutatione transferasi (ATGSTU23-8).

L'ultimo approccio bioinformatica è stata l'utilizzo del software MAPMAN. Con questa analisi è stato possibile visualizzare graficamente il metabolismo cellulare nei tre esperimenti.

Nel caso del confronto tra il genotipo resistente inoculato e il genotipo resistente non inoculato le categorie più rappresentative sono quelle della Degradazione delle proteine, Regolazione dell'RNA e Protein Protranslation nelle quali le proteine chinasiche sono quelle più rappresentative di questo processo. Nel confronto tra il genotipo suscettibile trattato e non trattato si rileva che la categoria degli ormoni è maggiormente rappresentata in questo tipo d'interazione. Nell'ultimo confronto

invece la categoria degli enzimi implicati nel metabolismo cellulare nel quale possiamo evidenziare l'attività della glutathione transferasi è maggiormente rappresentata.

È sembrato opportuno, poi, approfondire il processo di interazione durante il confronto tra il genotipo resistente inoculato e il genotipo suscettibile inoculato con la tecnica SSH. Con questa tecnica si è cercato di ampliare la nostra collezione dei trascritti e di evidenziare possibili trascritti rari o che non sono stati visualizzati con la tecnica microarray.

Anche per la tecnica SSH sono stati effettuati gli stessi approcci di bioinformatica svolti nella tecnica microarray, per poter analizzare le funzioni biologiche delle sequenze ottenute dalla libreria. Dall'analisi bioinformatica si evidenziano l'attivazione di processi di difesa relativi: all'attivazioni di geni di difesa, a prodotti del metabolismo secondario, alla risposta di geni relativi a stress idrici e geni implicati nella funzione della crescita cellulare.

I geni che risultano essere specifici nella difesa contro i patogeni sono la BGL2 (Glucan endo-1,3-beta-glucosidase) e serine/threonine protein kinase Pto gene.

Molti lavori mostrano l'aumento della  $\beta$ -glucanase in piante inoculate da funghi (Krebs & Grumet, 1993). Benhomou et al. (1990) riscontrarono l'accumulo di questo enzima con livelli più alti nella tesi incompatibile di pomodoro inoculata da *F. oxysporum* f.s. *radicis-lycopersici* rispetto alla tesi compatibile. In risposta all'attacco biotico una delle risposte di difesa delle piante sono le PR proteine. Le PR proteine comprendono le chitinasi, le Beta-glucanase, e le "chitin-binding proteins" (Kauffmann et al. 1987; Legrand et al. 1987; Ponstein et al. 1994). Le PR proteine (pathogenesis related) sono le prime studiate e che sono state associate al processo di difesa delle piante (van Loon and van Strien 1999); esse hanno anche un ruolo principale nel riconoscimento della razza specifica del patogeno durante il sistema di resistenza (Thomma et al. 2001). Tra i prodotti del metabolismo secondario è stato individuato il citocromo P450 noto ad essere implicato nei processi di difesa delle piante. Questo citocromo già era stato individuato nello stesso confronto tra il genotipo resistente inoculato e genotipo suscettibile inoculato analizzato con la tecnica microarray; questo suggerisce un probabile ruolo chiave in questo particolare processo di interazione pomodoro-Forl.

È stato, inoltre interessante evidenziare l'attivazione ai geni inerenti alla crescita come ad esempio nella sintesi delle cellule guardia e della formazione del citoscheletro (tubulina, actina). Questa tipologia di risposta è stato già evidenziato nel lavoro di Down et al. (2004) dove nell'analisi di radice di cotone infettate da *Fusarium oxysporum* è stato riscontrato una risposta di difesa legata all'attivazione di geni della crescita. Secondo questo studio la cessazione della crescita potrebbe essere legata al reindirizzamento delle risorse energetiche ai trascritti dei geni di difesa. Questa ipotesi sembrerebbe confermare il risultato nel nostro studio in quanto non solo molecularmente si è



potuto evidenziare questo processo ma anche in vivo in quanto durante le prove di inoculazione il genotipo Momor inculato ha mostrato una crescita molto ridotta rispetto al genotipo Monalbo inoculato.

Sono stati individuati attraverso il software Kegg i cicli metabolici che vengono attivati durante l'interazione resistenza/suscettibilità a Forl. Interessante è stato evidenziare come il ciclo biosintetico del Triptofano e della biosintesi del Glucosinolato siano collegati fra essi. Nel primo ciclo, infatti, vengono sintetizzati importanti prodotti del metabolismo secondari come i composti di difesa dell'indole-3-acetic acid (IAA) e dell'indole glucosinolate (Radwansky and Last,1995). I citocromi CYP79 appartenenti alla famiglia dei citocromi P450 convertono il triptofano a indole-3-acet-aldoxime composto intermedio della biosintesi dell'indole glucosinolato e del precursore dell'indole-3-acetonitrile (IAN) nella biosintesi dell'IAA (Normanly and Bartel,1999; Hull et al., 2000; Mikkelsen et al. (2003). Importante è quindi l'attivazione di questi pathway durante il processo di difesa, in quanto, durante l'attacco da patogeno avviene una produzione di questi metaboliti attraverso l'attivazione di CY79 (Mikkelsen et al., 2003).

Alcuni studi confermano come la produzione di composti di glucosinolato siano coinvolti nel processo di difesa. A tal proposito Mikkelsen et al. dimostrano che effettuando in Arabidopsis un trattamento con tre molecole di segnalazione come l'acido jasmonico, l'acido salicilico e l'etilene (note ad essere identificate durante la risposta di difesa delle piante) avviene una espressione o soppressione dei CYP79B3 a cui sono correlati l'accumulazione dei glucosinolati. È particolarmente importante evidenziare che l'etilene sopprime l'azione del citocromo. Questo porterebbe portare a ipotizzare nel nostro lavoro che durante l'interazione di suscettibilità in cui l'etilene (che svolge un ruolo principale in questa interazione) inibirebbe l'azione della famiglia dei citocromo P450 comportando alla non produzione dei prodotti di difesa dei glucosinolati. Nell'interazione di resistenza, invece, essendo l'etilene non espresso si potrebbe ipotizzare che i due pathway evidenziati vengano attivati con la produzione di glucosinolati implicati nel processo di difesa.

## 6. Conclusioni

Nel presente lavoro di dottorato è stato studiato il processo di interazione pomodoro-Forl su due linee isogeniche Momor (genotipo resistente) e Monalbo (genotipo suscettibile).

Il primo passo è stato quello di mettere a punto il saggio di patogenicità per poter ottenere il materiale di partenza per le analisi successive.

Il primo approccio molecolare, invece, è stato l'utilizzo della tecnica microarray. Con questa metodologia è stato possibile effettuare un'analisi globale dell'interazione pianta-patogeno. A tal proposito sono stati condotti quattro esperimenti microarray per poter effettuare tutti i possibili confronti attraverso i quali si è stato possibile analizzare il processo resistenza/suscettibilità.

Dopo aver condotto tutte le analisi statistiche sono state ottenute le liste dei trascritti differenzialmente espressi per i quattro esperimenti.

Successivamente per poter ottenere una annotazione funzionale si è proceduto nel confrontare i geni differenzialmente espressi con diversi database disponibili.

Sono stati scelti, poi, dieci geni differenzialmente espressi nei quattro esperimenti microarray per poter convalidare l'esperimento globale. La validazione è stata effettuata con la tecnica della Real Time Pcr con la quale è stata svolta anche un'analisi della variazione d'espressione dei dieci geni nei tre tempi differenti di inoculazione.

Sono stati utilizzati, inoltre, tre programmi di bioinformatica per poter eseguire un'analisi dettagliata della funzione biologica dei trascritti differenzialmente espressi. A tale scopo si è potuto evidenziare che nel confronto tra il genotipo resistente non inoculato con il genotipo suscettibile non inoculato non si sono rilevate significative differenze in quanto il numero dei trascritti differenzialmente espressi è stato irrilevante. Questo dato ha confermato che le due linee sono perfettamente isogeniche e che mostrano differenze solo quando sono sottoposte a stress biotico.

Nel confronto tra del genotipo resistente inoculato e il genotipo suscettibile resistente inoculato si è evidenziato che le proteine chinasiche svolgono un ruolo chiave nelle differenze d'interazione mentre nel confronto tra il genotipo suscettibile inoculato e non, l'etilene risulterebbe avere un ruolo principale nel processo di suscettibilità.

Nell'analisi tra il genotipo resistente inoculato e il genotipo suscettibile inoculato, invece, la famiglia dei citocromi P450, della Glutathione-transferasi sembrerebbero essere essenziali per attivare la risposta di difesa durante il processo di infezione.

Un altro approccio molecolare utilizzato è stato mediante l'impiego della tecnica SSH con la quale è stato analizzato il confronto tra il genotipo resistente inoculato e il genotipo suscettibile inoculato.

Con questo approccio è stato confermato un ruolo chiave della famiglia dei citocromi P450 e sono stati rilevati l'azione fondamentale della beta-glucanase e di alcuni geni implicati del processo di crescita.

Sono stati costruiti i cicli metabolici per ogni esperimento microarray e individuata un'ipotesi biologia nel processo d'interazione Forl-pomodoro.

Gli studi condotti sullo studio del processo resistenza/ suscettibilità tra pomodoro-Forl hanno permesso, quindi, di apportare nuove conoscenze sul meccanismo di risposta nei genotipi resistenti e suscettibili in pomodoro.

## 7. Bibliografia

- Anterola A.M., Lewis N.G. (2002) Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry* 61: 221–294
- Balaji V., Mayrose M., Sherf O., Jacob-Hirsch J., Eichenlaub R., Iraki N., Manulis-Sasson S., Rechavi G., Barash I., Sessa G. (2008) Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. *Plant Physiol* 146:1797-1809
- Baldwin D., Crane V., and Rice D. (1999). A comparison of gel-based, nylon filter and microarray techniques to detect differential rna expression in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 2, 96-103
- Beguiristain T., Grandbastien M.A., Puigdomenech P., Casacuberta J.M. (2001) Three Tnt1 subfamilies show different stress-associated patterns of expression in tobacco. Consequences for retrotransposon control and evolution in plants. *Plant Physiol* 127:212– 22
- Ben-David C., Bashan, Y., and Okon, Y. (1986). Ethylene production in pepper (*Capsicum annuum*) leaves infected with *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 29, 305–316.
- Benhamou N., Joosten Matthieu H. A. J., And De Wit Pierre J. G. M. (1990). Subcellular localization of chitinase and of its potential substrate in tomato root tissues infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Physiol.* 92, 1108-1120.
- Benson D., Lipman D.J., Ostell J. GenBank. (1993). *Nucl Acid Res* 21:2963-2965.
- Boller T. (1991). Ethylene in pathogenesis and disease resistance. In *The Plant Hormone Ethylene*, A.K. Mattoo and J.C. Suttle, eds (Boca Raton, FL: CRC Press), pp. 293–314.
- Brown P. O. e Botstein D. (1999). Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat. Genet* (suppl. 1) 21:23
- Brown C.S., P.C. Goodwin, and P.K. Sorger, Image metrics in the statistical analysis of DNA microarray data. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(16): p. 8944-9.
- Catoni M, Miozzi L, Fiorilli V, Lanfranco L, Accotto GP (2009) Comparative analysis of expression profiles in shoots and roots of tomato systemically infected by *Tomato spotted wilt virus* reveals organ-specific transcriptional responses. *Mol Plant Microbe Interact* 22:1504-1513
- Cervone F., Castoria R., Leckie F., De Lorenzo G. 1997. Perception of fungal elicitors and signal transduction. *Signal Transduction in Plants*, P. Aducci (ed.), Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland, pp. 153-177.
- Chen X., Zeng Q., Wood A.J. (2002) The stress-responsive *Tortula ruralis* gene ALDH21A1 describes a novel eukaryotic aldehyde dehydrogenase protein family. *J Plant Physiol* 159:677–684. doi: 10.1078/0176-1617-0813

Chen, N. J. Provart, J. Glazebrook, F. Katagiri, H. S. Chang, T. Eulgem, F. Mauch, S. Luan, G. Zou, S. A. Whitham, P. R. Budworth, Y. Tao, Z. Xie, X. Chen, S. Lam, J. A. Kreps, J. F. Harper, A. Si-Ammour, B. Mauch-Mani, M. Heinlein, K. Kobayashi, T. Hohn, J. L. Dangel, X. Wang, and T. Zhu. Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell*, 14(3):559{574, March 2002. ISSN 1040-4651. doi: 10.1105/tpc.010410.

de Laat, C.M.M., and Van Loon, L.C. (1983). The relationship between stimulated ethylene production and symptom expression in virus-infected tobacco leaves. *Physiol. Plant Pathol.* 22, 261–273.

Desikan R., Burnett E.C., Hancock J.T., Neill S..J (1998b). Harpin and hydrogen peroxide induce the expression of a homologue of *gp91-phox* in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *J Exp Bot* 49: 1767–1771

Dixon RA (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411: 843–847

Dowd c., Wilson L. W., McFadden Helen. (2004). Gene expression profile changes in cotton root and hypocotyls tissues in response to infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. The American Phytopathological Society vo. 17, n 6; pp.654:667.

Elad Y. (1990). Production of ethylene in tissues of tomato, pepper, French-bean and cucumber in response to infection by *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36, 277–287.

Eulgem, T., Weigman, V. J, Chang, H. S., McDowell, J. M., Holub, E. B., Glazebrook, J., Zhu, T., and Dangel, J. L. 2004. Gene expression signatures from three genetically separable resistance gene signaling pathways for downy mildew resistance. *Plant Physiol.* 135:1129-1144.

Ferraris I.L., Gentle I.A., Matta A., 1987. Activation of glycosidases as a consequence of infection stress in *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of Phytopathology* 118, 317–25.

Flor H. H., 1971. Current status of the gene for gene concept. *Annual Review Phytopathology* 9: 275-296.

Gentile I.C., and Matta C. (1975). Production of and some effects of ethylene in relation to *Fusarium* wilt of tomato. *Physiol. Plant Pathol.* 5, 27–35.

Goto M., Yaguchi, Y., and Hyodo, H. (1980). Ethylene production in citrus leaves infected with *Xanthomonas citri* and its relation to defoliation. *Physiol. Plant Pathol.* 16, 343–350.

Grant J.J., Yun B-W, Loake GJ (2000) Oxidative burst and cognate redox signalling reported by luciferase imaging: identification of a signal network that functions independently of ethylene, SA and Me-JA but is dependent on MAPKK activity. *Plant J* 24: 569–582

Guerrero F.D., Jones J.T., Mullet J.E. (1990) Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. *Plant Mol Biol* 15:11–26. doi:10.1007/BF00017720

Halkier B. A., and Du L. (1997). The biosynthesis of glucosinolates. *Trends Plant. Sci* 11:425-430.

- Hammond-Kosack K.E., Jones J.D.G., 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8:1773-91
- Hirochika H., Otsuki H., Yoshikawa M., Otsuki Y., Sugimoto K., Takeda S. (1996a) Autonomous transposition of the tobacco retrotransposon Tto1 in rice. *Plant Cell* 8:725–734
- Hirochika H., Sugimoto K., Otsuki Y., Tsugawa H., Kanda M. (1996b) Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7783–7788
- Hoffman T., et al. (1999). Isolation of ethylene-insensitive soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene-for-gene disease resistance. *Plant Physiol.* 119, 935:949.
- Hong Y., Takano M., Liu C.-M., Gasch A., Chye M.L., and Chua N.-H., (1996). Expression of three members of the calcium-dependent protein kinase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Mol. Biol.* 30, 1259-1275.
- Hrabak E. M., Dickman L. J., Satterlee J. S., and Sussman M. R. (1996). Characterization of eight new members of the calmodulin-like domain protein kinase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 31, 405-412.
- Hull A.K., Vij R., and Celenza J.L. (2000). *Arabidopsis* cytochrome p450<sub>s</sub> that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3acetic acid biosynthesis. *Proc. Ntl. Acad. Sci USA* 97:2379-2384.
- Iruela M., Piston F., Cubero J. I., Millan T., Barro F., Gil J., (2009). The marker SCK13603 associated with resistance to ascochyta blight in chickpea is located in a region of a putative retrotransposon. *Plant Cell Rep* 28:53–60 DOI 10.1007/s00299-008-0609-7
- Kauffmann, S., M. Legrandp., G Eoffrey and B. Fritig, (1987). Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3-P-glucanase activity. *EMBO J.* 6: 3209-3212.
- Keen N., 1990. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Genetics* 24: 447.
- Kirch H.H., Nair A, Bartels D (2001) Novel ABA- and dehydrationinducible aldehyde dehydrogenase genes isolated from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 28:555–567. doi:10.1046/j.1365-313X.2001. 01176.
- Knogge W., 1996. Fungal infection of plants. *The Plant Cell* 8: 1711-1722.
- Kooperberg, C., et al., Improved background correction for spotted DNA microarrays. *J Comput Biol*, 2002. 9(1): p. 55-66.
- Krebs S.L., Grumet, R.: Affinity purification and characterization of a  $\beta$ -1,3-glucanase from celery. – *Plant Sci.* 93: 31-39, 1993.
- Lagopodi Anastasia L., Ram Arthur F. J., Lamers Gerda E. M., Punt Peter J., Van den Hondel Cees A. M. J. J., Lungtenberg Ben J. J. and Bloemberg Guido V., 2001. The American Phytopathological Society pp 172-179.

- Lamb C., Dixon R.A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 251–275
- Lawton M.A., Yamamoto R.T., Hanks S.K., Lamb C.J.: Molecular cloning of plant transcripts encoding protein kinase homologs. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:3140-3144 (1989).
- Legrandm, S. Kauffmann, P. Geoffroyand, B. Fritig. (1987). Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6750-6754.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583–593
- Lipshutz et al, 1999, Fodor S.P., Gingeras T.R. and Lockhart D. J. (1999). High density synthetic oligonucleotide array. *Nature Genet.*, 21 (Suppl.) 20-24.
- Loh YT, Zhou J, Martin GB. The myristylation motif of Pto is not required for disease. *Mol Plant Microbe Interact.* 11:572-76
- Maleck K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K. A., Dangl, J. L., and Dietrich, R. A. 2000. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat. Genet.* 26:403-410.
- Maleck K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K. A., Dangl, J. L., and Dietrich, R. A. 2000. The transcriptome of *Arabidopsisthaliana* during systemic acquirednresistance. *Nat. Genet.* 26:403-410.
- Martin G. B., 1999. Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 273-279.
- Martin G. B., Bondanove A.J. and Sessa G. 2003. Understanding the functions of plant desease resistance proteins. *Annu. Rev. Plant Biology* 54:23-61
- Martin GB, Brommonschenkel SH, Chunwongse J, Frary A, Ganai MW, et al. 1993. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262:1432-36
- Martinez, M.J., et al., Identification and removal of contaminating fluorescence from commercial and in-house printed DNA microarrays. *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(4): p. 18.
- Mathilde Langlois-Meurinne, Claire M.M. Gachon, and Patrick Saindrenan (2005). Pathogen-Responsive Expression of Glycosyltransferase Genes UGT73B3 and UGT73B5 Is Necessary for Resistance to *Pseudomonas syringe* e pv tomato in Arabidopsis. *Plant Physiol.* Vol. 139
- Mikkelsen M.D., Hansen C.H., Wittstock U., and Halkier B.A. (2000). Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3acetic acid. *J.Biol. Chem.* 275:33712-33717.
- Mikkelsen M. D., Petersen B. L., Glawischnig E., Jensen A. B., Andreasson E., and Halkier B. A. (2003). Modulation of CYP79 genes and glucosinolate profiles in Arabidopsis by defense signaling pathways. *Plant Physiol.* 131:298-308

- Mysore K.S., Crasta O.R., Tuori R.P., Folkerts O., Swirsky P.B., Martin G.B. (2002) Comprehensive transcript profiling of *Pto*- and *Prf*-mediated host defense responses to infection by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Plant J* 32:299-315
- Normanly J. and Bartel B. (1999). Redundancy as a way of life-IAA metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2:207-213.
- Ozturk ZN, Talame V, Deyholos M, Michalowski CB, Galbraith DW, Gozukirmizi N et al (2002) Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Mol Biol* 48:551–573. doi:10.1023/A:1014875215580 Perozich J, Nicholas H, Wang BC, Lindahl R, Hempel J (1999)
- Pegg G.F. (1981). The involvement of growth regulators in the diseased plant. In *Effects of Disease on the Physiology of the Growing Plant*, P.G. Ayres, ed (New York: Cambridge University Press), pp. 149–178.
- Pegg G.F., and Cronshaw, D.K. (1976a). The relationship of in vitro and in vivo ethylene production in *Pseudomonas solanacearum* infection of tomato. *Physiol. Plant Pathol.* 9, 145–154.
- Pegg G.F., and Cronshaw, D.K. (1976b). Ethylene production in tomato plants infected with *Verticillium albo-atrum*. *Physiol. Plant Pathol.* 8, 279–295.
- Ponstein A.S., Bres-Vloemans S.A., Sela-Buurlage M.B., Vandenelzeln P.J.M., Melchers L.S., Cornelissen B.J.C. (1994). A novel pathogen- and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity. *Plant Physiol.* 104: 109- 118.
- Pouteau S., Huttner E., Grandbastien M-A, Caboche M: Specific expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon in protoplast. *EMBO J* 10: 1911–1918 (1991).
- Quirino B. F., and Bent, A. F. 2003. Deciphering host resistance and pathogen virulence: The *Arabidopsis/Pseudomonas* interaction as a model. *Mol. Plant Pathol.* 4:517-530.
- Radwanski E. R., Last R. L. (1995). Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. *Plant Cell* 7:921-934.
- Robb J, Lee B, Nazar RN (2007) Gene suppression in a tolerant tomato-vascular pathogen interaction. *Planta* 226:299-309
- Roberts P. D., McGovern R., and Datnoff L. E. (2000). Fusarium Crown and Root Rot of Tomato in Florida. *Plant Pathology Fact Sheet SP-184*.
- Ross AF. 1961. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* 14:340-58
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner H-Y, Hunt MD, 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8:1809-19
- Scheel D. (1998). Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin Plant Biol.* 1, 305-310



- Scheideler M., Schlaich, N. L., Fellenberg, K., Beissbarth, T., Hauser, N. C., Vingron, M., Slusarenko, A. J., and Hoheisel, J. D. 2002. Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolism in *Arabidopsis thaliana* using cDNA arrays. *J. Biol. Chem.* 277:10555-10561.
- Schena D., Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary dna microarray. *Science*, 270(5235):467 (470, October 1995). ISSN 0036-8075. doi: 10.1126/science.270.5235.467.
- Schenk M., Kazan K., Wilson I., Anderson J. P., Richmond T., Somerville S. C., and Manners J. M.. Coordinated plant defense responses in arabidopsis revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(21):11655{11660, October 2000. doi: 10.1073/pnas.97.21.11655.
- Schuchhardt, D. Beule, A. Malik, E. Wolski, H. Eickho\_, H. Lehrach, and H. Herzel. Normalization strategies for cdna microarrays. *Nucleic Acids Res*, 28(10), May 2000. ISSN 1362-4962.
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y et al (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J* 31:279–292. doi:10.1046/j.1365-313X.2002.01359.
- Silver J.D., M.E. Ritchie, and G.K. Smyth, Microarray background correction: maximum likelihood estimation for the normal-exponential convolution. *Biostatistics*, 2009. 10(2): p. 352-63.
- Song WY, Wang G-L, Chen L-L, Kim H-S, Pi L-Y et al. 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease gene, Xa21. *Science* 270:1804-6
- Southern E.M. (1975). ) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98, 503–517
- Spanu P., and Boller, T. (1989). Ethylene biosynthesis in tomato plants infected by *Phytophthora infestans*. *J. Plant Physiol.* 134, 533–537.
- Stall R.E., and Hall, C.B. (1984). Chlorosis and ethylene production in pepper leaves infected with *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *Phytopathology* 74, 373–375.
- Staskawicz B. J., Ausubel F. M., Baker B. J., Ellis, J. G., Jones J. D. G., 1995. Molecular Genetics of Plant Disease Resistance. *Science*, vol. 268: 661-667.
- Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux JP. 1997. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35:325-70
- Stroeher V.L., Boothe J.G., Good AG (1995) Molecular cloning and expression of a turgor-responsive gene in *Brassica napus*. *Plant Mol Biol* 27:541–551. doi:10.1007/BF00019320
- Takeda S., Sugimoto K., Otsuki H., Hirochika H. (1998) Transcriptional activation of the tobacco retrotransposon Tto1 by wounding and methyl jasmonate. *Plant Mol Biol* 36:365–376
- Thomma B. P. H. J., Penninckx, I. A. M. A., Cammue, B. P. A., and Broekaert, W. F. 2001. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Immunol.* 13:63-68.

- van Baarlen P., van Esse, H. P., Siezen, R. J., and Thomma, B. P. H. J. 2008. Challenges in plant cellular pathway reconstruction based on gene expression profiling. *Trends Plant Sci.* 13:44-50.
- Van Esse HP, Fradin EF, de Groot PJ, de Wit PJ, Thomma BP (2009) Tomato transcriptional responses to a foliar and avascular fungal pathogen are distinct. *Mol Plant Microbe Interact* 22:245-258
- Van Loon L.C., van Kammen A. 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf protein from *Nicotiana tabacum* var. “Samsun” and “Samsun NN”. II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40:199-211
- van Loon, L. C., and van Strien, E. A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 55:85-97.
- van Wees, S. C. M., Chang, H., Zhu, T., and Glazebrook, J. 2003. Characterization of the early response of *Arabidopsis* to *Alternaria brassicicola* infection using expression profiling. *Plant Physiol.* 132:606-617.
- Vet LEM, Dicke M (1992) The ecology of infochemical use by natural enemies of herbivores in a tritrophic context. *Annu Rev Entomol* 37:141–172
- Vogt T, Jones P (2000) Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends Plant Sci* 5:380–386
- Warren M. Kruger, Clara Pritsch, Shiaoan Chao, and Gary J. Muehlbauer (2001). Functional and Comparative Bioinformatic Analysis of Expressed Genes from Wheat Spikes Infected with *Fusarium graminearum*. *Plant Physiol.* Vol. 127
- Weil CF, Wessler S.R.: The effects of plant transposable element insertion on transcription initiation and RNA processing. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41: 527–552 (1990).
- Wessler S.R., Bureau T.E., White S.E.: LTR-retrotransposons and MITEs: important players in the evolution of plant genomes. *Curr Opin Genet Devel* 5: 814–821 (1995).
- Wise R. P., Moscou, M. J., Bogdanove, A. J., and Whitham, S. A. 2007. Transcript profiling in host–pathogen interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45:329-369.
- Xu L., Nonomura T., Suzuki S., Kitagawa Y., Tajima H., Okada K., Kusukari S., Matsuda Y. And Toyoda H., 2006. Symptomatic evidence for differential root invasion by *Fusarium crown and root rot* pathogens between common tomato *Lycopersicon esculentum* and its varieties. *J. Phytopathology* 154, 577-586
- Yang Y., Shah J., and Klessing D. F. (1997). Signal perception and transduction in plant defence responses. *Gene Dev.* 11, 1621-1639.
- Zur Erlangung des Doktorgrades, 2004. Molecular and physiological characterization of transgenic *Arabidopsis* plants expressing different aldehyde dehydrogenase (*ALDH*) genes. Tesi dottorato.